MONOGRAPHIES DE L'INSTITUT PASTEUR

F. D'HERELLE
De l'Institut Pasteur

LE BACTÉRIOPHAGE

SON ROLE DANS L'IMMUNITÉ

MASSON ET C^IE, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS-VI^e
1921

2213



PLANCHE I

MULTIPLICATION DES ULTRAMICROBES BACTÉRIOPHAGES

Une émulsion bactérienne est inoculée avec un milliardième de centimètre cube d'un filtrat renfermant le Bactériophage De temps à autre on prélève un cinquantième de centimètre cube de l'émulsion que l'on étale sur gélose. Après incubation à l'étuve, on obtient

Tube 1. — Etalement de suite après l'inoculation · culture normale de la bactérie

Tube 2. — Etalement après 1 h. 15' culture normale de la bactérie

Tube 3. — Etalement après 2 h. 30' . trois colonies d'ultramicrobes bactériophages rongeant la couche de culture bactérienne.

Tube 4. — Etalement après 2 h. 45'. colonies confluentes d'ultramicrobes bactériophages parsemant la couche de culture bactérienne.

Tube 5. — Etalement après 5 h : aucune trace de culture bactérienne, le nombre des ultramicrobes est tel que toutes les bactéries sont détruites

---







LISTE DES COMMUNICATIONS SUR LE BACTÉRIOPHAGE

(F. d'Herelle et collaborateurs)

1. F. d'Herelle. — Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXV, p. 373, 10 septembre 1917.
2. F. d'Herelle. — Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXI, p. 1160, 7 déc. 1918.
3. F. d'Herelle. — Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXVII, p. 970, 9 déc. 1918.
4. F. d'Herelle. — Du rôle du microbe filtrant bactériophage dans la fièvre typhoïde. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXVIII, p. 631, 2 mars 1919.
5. F. d'Herelle. — Sur une épizootie de typhose aviaire. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXIX, p. 817, 3 nov. 1919.
6. F. d'Herelle. — Sur le rôle du microbe bactériophage dans la typhose aviaire. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXIX, p. 932, 17 nov. 1919.
7. F. d'Herelle. — Sur le microbe bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXII, p. 1237, 29 nov. 1919.
8. F. d'Herelle. — Sur la résistance des bactéries à l'action du bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 97, 31 janvier 1920.
9. F. d'Herelle. — Le processus de défense contre les bacilles intestinaux et l'étiologie des maladies intestinales. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXX, p. 72, 5 janv. 1920.
10. F. d'Herelle. — Sur le microbe bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 247, 6 mars 1920.
11. F. d'Herelle. — Sur le microbe bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1318, 23 oct. 1920.
12. F. d'Herelle. — Sur la nature du principe bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1320, 23 oct. 1920.
13. J. Bablet. — Sur le principe bactériophage de d'Herelle. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1322, 23 oct. 1920.
14. F. d'Herelle. — Le microbe bactériophage agent d'immunité dans la peste et le barbone. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXXII, p. 99, 3 janvier 1921.
15. F. d'Herelle. — Sur la nature du bactériophage (Bacteriophagum intestinale de d'Herelle, 1918). *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 339, 19 fév. 1921.
16. F. d'Herelle. — Phénomènes coïncidant avec l'acquisition de la résistance des bactéries à l'action du microbe bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 382, 26 fév. 1921.
17. F. d'Herelle. — Rôle du bactériophage dans l'immunité. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 538, 19 mars 1921.

18 F. d'Herelle et G. Eliava. — Sur le sérum antibactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 719, 23 avril 1921.

19 G. Eliava et E. Pozerski. — Sur les caractères nouveaux présentés par le bacille de Shiga ayant résisté à l'action du bactériophage de d'Herelle. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 708, 23 avril 1921.

20 F. d'Herelle. — Sur l'historique du bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 863, 14 mai 1921.

21. F. d'Herelle. — Sur la nature du bactériophage. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 908, 21 mai 1921.

22 F. d'Herelle. — Le bactériophage, son rôle dans l'immunité. *La Presse Médicale*, 11 juin 1921.

23 G. Eliava et E. Pozerski. — De l'action destructive des sels de quinine sur le bactériophage de d'Herelle. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXV, p. 139, 25 juin 1921.

AUTRES COMMUNICATIONS

E. Damade. — Le microbe filtrant bactériophage de d'Herelle, *in* Thèse pour le doctorat en médecine. Bordeaux, août 1919.

T. Kabeshima. — Recherches expérimentales sur la vaccination préventive contre le bacille de Shiga. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXIX, p. 1061, 1er décembre 1919.

T. Kabeshima. — Thérapie expérimentale des porteurs de germes. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXX, p. 71, 5 janv. 1920.

T. Kabeshima. — Sur un ferment d'immunité bactériolysant. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 219, 28 février 1920.

T. Kabeshima. — Sur le ferment d'immunité bactériolysant. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 471, 17 avril 1920.

S. Métalnikov. — B. dysentérique et bactériophage de d'Herelle chez les chenilles de *Galleria mellonella*. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 619, 8 mai 1920.

J. Bordet et M. Ciuca. — Exsudats leucocytaires et autolyse microbienne transmissible. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1293, 9 oct. 1920.

J. Bordet et M. Ciuca. — Le Bactériophage de d'Herelle, sa production et son interprétation. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1296, 9 oct. 1920.

J. Dumas. — Sur la présence du bactériophage dans l'intestin sain, dans la terre et dans l'eau. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, t. 1314, 20 octobre 1920.

Salimbeni. — Sur la nature du bactériophage de d'Herelle. *C. R. Ac. Sciences*, t. CLXXI, p. 1240, 13 déc. 1920.

Salimbeni. — Sur le bactériophage de d'Herelle. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1545, 11 déc. 1920.

E. Wollman. — A propos de la note de Bordet et Ciuca (Phénomène de d'Herelle), autolyse microbienne transmissible de Bordet et Ciuca et hypothèse de la pangénèse de Darwin. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXIII, p. 1478, 27 novembre 1920.

ROBERT DEBRÉ et HAGUENAU — Quelques particularités du phénomène de D'HERELLE *C R Soc. Biologie*, t LXXXIII, p 1348, 30 oct. 1920

E. WOLLMAN. — Sur le phénomène de D'HERELLE *C R Soc. Biologie*, t LXXXIV, p. 3, 8 janvier 1921

ANDRÉ GRATIA — Influence de la réaction du milieu sur l'autolyse microbienne transmissible *C. R Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p 275, 29 janvier 1921.

J. BORDET et M CIUCA — Déterminisme de l'autolyse microbienne transmissible *C R Soc Biologie*, t LXXXIV, p. 276, 29 janvier 1921

J. BORDET et M CIUCA. — Spécificité de l'autolyse microbienne transmissible *C R Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p. 278, 29 janvier 1921

J BORDET et M CIUCA — Autolyse microbienne et sérum antilytique *C R Soc Biologie*, t. LXXXIV, p 280, 29 janvier 1921.

MAISIN. — Au sujet de la nature du principe bactériophage *C R. Soc Biologie*, t LXXXIV, p 467, 26 février 1921

MAISIN — Adaptation du bactériophage. *C. R Soc Biologie*, t LXXXIV, p 468, 26 février 1921

J BORDET et M CIUCA. — Remarques sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible *C R Soc Biologie*, t LXXXIV, p 745, 26 mars 1921

J BORDET et M CIUCA — Guérison et retour à l'état primitif par le sérum antilytique du *coli* lysogène *C R Soc Biologie*, t LXXXIV, p 748, 26 mars 1921

ANDRÉ GRATIA — Sur l'adaptation héréditaire du colibacille à l'autolyse microbienne transmissible *C R Soc Biologie*, t LXXXIV, p 750, 26 mars 1921

ANDRÉ GRATIA. — Dissociation d'une souche de colibacilles en deux types d'individus de propriétés et de virulences différentes. *C R Soc Biologie*, t LXXXIV, p. 751, 26 mars 1921.

ANDRÉ GRATIA — Sur la signification des colonies de bactériophages de D'HERELLE. *C R. Soc. Biologie*, t. LXXXIV, p 753, 26 mars 1921.

ANDRÉ GRATIA — Sur la spécificité du principe lytique. *C R Soc Biologie*, t LXXXIV, p. 755, 26 mars 1921.

J. MAISIN — Au sujet du principe bactériophage et des anticorps *C R. Soc. Biologie*, t LXXXIV, p. 755, 26 mars 1921.

R BRUYNOGHE et J MAISIN — Au sujet des microbes devenus résistants au principe bactériophage *C. R Soc Biologie*, t LXXXIV, p 847, 30 avril 1921

OSCAR BAIL — Das bacteriophage virus von D'HERELLE *Wiener klinische Wochenschrift*, 15 mai 1921.

R. BRUYNOGHE. — Au sujet de la guérison des germes devenus résistants au principe bactériophage. *C. R Soc. Biologie*, t. LXXXV, p 20, 28 mai 1921.

ANDRÉ GRATIA. — L'autolyse transmissible du staphylocoque et l'action coagulante des cultures lysées. *C. R Soc. Biologie*, t LXXXV, p 25, 28 mai 1921.

ANDRÉ GRATIA. — Autolyse transmissible et variations microbiennes *C R Soc. Biologie*, t LXXXV, p 251, 25 juin 1921

R. BRUYNOGHE. — Au sujet de la nature du principe bactériophage *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXXV, p 258, 25 juin 1921.

AVANT-PROPOS

Je n'envisagerai dans cet ouvrage que les recherches que j'ai effectuées . il s'agit d'une mise au point développée des diverses Notes et Communications publiées depuis 1917.

J'ai commencé l'étude du phénomène sans aucune idée préconçue : je n'avais, même pas involontairement, de « désir » au sujet de la nature du principe qui en était la cause. Que m'importait d'ailleurs ? Que ce principe fut une diastase, un germe vivant ou une propriété nouvelle quelconque d'une bactérie, l'intérêt restait le même. Ce n'est qu'après deux ans de recherches et des centaines d'expériences, plus démonstratives les unes que les autres, que j'ai acquis la conviction que la cause de la bactériolyse transmissible en série ne pouvait être qu'un germe vivant : c'est seulement alors que j'ai présenté la première Communication sur le sujet. Ce n'est que trois ans plus tard que l'attention a été attirée sur le phénomène et que divers savants ont commencé à leur tour leurs recherches, émettant, pour la plupart, des hypothèses différentes de celle que je soutiens touchant la nature du principe auquel il faut attribuer les phénomènes que nous allons passer en revue. Aucun d'eux d'ailleurs n'a envisagé toute l'étendue de ces phénomènes, chacun d'eux a pris dans un ensemble de faits un point particulier, propre à étayer sa thèse, sans se préoccuper des expériences qui rendaient cette thèse inadmissible. Toutes ces hypothèses, je les avais envisagées avant toute publication, j'avais effectué de nombreuses expériences dans le but de trancher la question pour moi-même : j'en ai fait connaître les résultats dans les Notes que j'ai publiées et aucun de mes contradicteurs n'y a répondu, n'y a même fait allusion. Je ferai naturellement mention de ces expériences dans cet ouvrage, qui contient, par là même, la réfutation des expériences et des interprétations tendant à attribuer aux

phénomènes provoqués par le Bactériophage une nature purement diastasique, quelle que soit d'ailleurs l'origine que les divers auteurs ont voulu attribuer à leur diastase : qu'ils la fassent dériver de l'organisme qui se défend contre l'infection ou de la bactérie infectieuse elle-même.

Et si le lecteur trouve parfois au cours de cette étude que j'exagère les répétitions, ou bien qu'il doit faire un effort pour suivre certaines expériences, qu'il songe qu'il s'agit, non pas seulement de phénomènes nouveaux auxquels son esprit n'est pas encore préparé, mais encore de phénomènes d'une complexité extrême. L'image suivante lui permettra de se rendre compte de la difficulté d'exposition dans un tel sujet : la Bactériologie n'a jusqu'ici envisagé que le « problème des deux corps », bactérie et milieu, que ce milieu soit l'organisme parasité ou le liquide au sein duquel se fait la culture, et ce problème des deux corps était déjà bien complexe ; il l'était pourtant beaucoup moins que « le problème des trois corps » que nous allons aborder, où nous aurons à envisager les interactions entre le milieu, milieu de culture ou organisme parasité, la bactérie parasitant ce milieu et l'ultramicrobe bactériophage parasite de la bactérie

Paris, 1er juillet 1921.

PREMIÈRE PARTIE

LE BACTÉRIOPHAGE



INTRODUCTION

HISTORIQUE

Je n'ai pu relever dans la littérature scientifique que deux Mémoires pouvant se rapporter à la question du Bactériophage.

Le premier en date est de HANKIN (1). Cet auteur indique qu'il a constaté que l'eau de certains fleuves de l'Inde possédait une action antiseptique extrêmement marquée pour les bactéries en général et le vibrion cholérique en particulier. Ainsi, l'eau de la Jumna contient, au sortir de la ville d'Agra, plus de 100 000 bactéries par centimètre cube ; 5 km. plus bas elle n'en contient plus que 90 à 100.

En ce qui concerne plus particulièrement le vibrion cholérique, des expériences de laboratoire lui ont fourni les résultats suivants (la première ligne se rapporte à l'eau de la Jumna filtrée sur bougie, ceux de la seconde à la même eau filtrée et bouillie ; l'eau en expérience étant ensemencée avec une culture de vibrions) :

	Nombre de germes après .						
	0	1	2	3	4	25	49 h
1.	2.500	1.500	1.000	500	0	0	0
2.	5.000	4.000	6.000	10.000	6.000	10.000	36 000

L'action antiseptique de l'eau de ces fleuves était habituelle, mais non pas constante. C'est à cette action antiseptique que HANKIN attribue le fait qu'on n'a jamais pu incriminer l'ingestion de l'eau de l'un de ces fleuves comme étant l'origine d'un cas de choléra. Jamais non plus ces fleuves n'ont été les vecteurs d'épidémies, la propagation se faisant toujours d'aval en amont.

(1) L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du choléra, *Ann. Inst. Pasteur*, t. X, nº 9

Hankin constate que le principe antiseptique est détruit par l'ébullition et croit pouvoir affirmer qu'il s'agit d'une substance volatile.

Il ne me paraît pas douteux que cette action antiseptique devait en réalité être le fait du Bactériophage, ce qui serait facile à vérifier pour un bactériologue de l'Inde.

Le second Mémoire est de Twort (1); il a pour titre : « Etude sur la nature des virus ultramicroscopiques ». Au cours d'expériences sur le virus filtrant de la vaccine, l'auteur a obtenu, sur certains tubes de gélose inclinée ensemencés avec de la pulpe vaccinale glycérinée, une culture d'un micrococque dont certaines colonies prenaient un aspect vitreux et transparent, le micrococque étant remplacé par de fins granules. D'autres fois il obtenait une culture en nappe présentant des taches, constituées par la même matière vitreuse, qui envahissaient peu à peu toute la culture; le micrococque étant partout transformé en granules Une culture pure du micrococque, touchée en un point avec un fil de platine préalablement mis en contact avec la matière vitreuse, donnait naissance à une tache de même nature qui s'étendait peu à peu sur toute la surface. L'action était faible sur des cultures préalablement tuées. La substance, d'aspect vitreux, diluée, passait à travers un filtre de porcelaine, car une goutte du filtrat transformait une culture saine en une culture d'aspect vitreux : l'action commençait à se manifester en des points et gagnait rapidement toute la surface; pourtant, si un point de la culture saine n'avait pas été en contact avec le filtrat, la culture saine reprenait le dessus et recouvrait la couche d'aspect vitreux, sans pourtant la détruire. La matière transparente d'aspect vitreux se conservait active pendant au moins six mois, elle résistait à la température de 52°, mais était détruite à 60°. Twort a obtenu des résultats semblables avec un bacille du groupe *coli*, isolé de la muqueuse intestinale d'un chien atteint de la maladie des jeunes Chiens, et avec un gros bacille, n'appartenant pas au groupe du *B. coli*, isolé du contenu intestinal d'un enfant atteint de diarrhée infantile Dans tous les cas il s'agit de la transformation de cultures normales en une matière transparente d'aspect vitreux.

L'auteur passe ensuite en revue les différentes hypothèses qu'il considère comme possibles touchant la cause de la transforma-

(1) An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses. *The Lancet*, 4 déc. 1915

on des cultures. La substance d'aspect vitreux, dit-il, contient certinement une enzyme qui est détruite à 60°; d'un autre côté cette ıbstance est susceptible de croître indéfiniment puisqu'elle est ıdéfiniment repiquable sur une culture du microcoque. S'agit-il 'une enzyme cultivable ? D'un protoplasma vivant sans forme défiie ? S'agit-il d'une forme ancestrale du microcoque qui ne se peut ıltiver sous cette forme, mais qui incite le microcoque normal à rendre cette forme de régression ? Ou bien d'une enzyme sécrétée ar le microcoque lui-même qui produit ainsi sa propre destruction, vec formation d'une nouvelle quantité d'enzyme destructive ? La ıbstance d'aspect vitreux est-elle enfin constituée par un virus filant qui serait lui-même le virus de la vaccine ou encore un virus trant non pathogène, ce dernier pouvant provenir de l'air et venir ontaminer les cultures du microcoque en traversant la bourre de oton fermant le tube ? Twort ne choisit pas entre les diverses hypoièses qu'il formule, il lui semble pourtant probable que la subance vitreuse est produite par le microcoque lui-même. Il indique : plus qu'il n'a aucune idée au sujet du rapport qui peut exister ıtre le bacille ou le microcoque, la matière vitreuse et la maladie

Le Bactériophage est-il en cause dans le phénomène, par ailleurs ès intéressant, décrit par Twort ? C'est possible, mais peu vraimblable, étant donné les différences qui existent entre les deux ıénomènes Ce à quoi les faits décrits par Twort se rapprocheıent le plus, seraient ceux qui ont rapport aux cultures secondais, avec toutefois de très grandes différences. Comme nous le verns, dans les cultures secondaires, si les bactéries résistantes sont ées à 60°, le Bactériophage qui provoque la lyse n'est détruit qu'à °. Ce dernier fait seul suffirait à montrer que le Bactériophage ne ıt pas être en cause dans le phénomène décrit par Twort et dans quel, comme il le croit, il est possible que le principe actif soit de ture diastasique, étant donné la température de destruction de n élément actif : nous sommes encore loin de connaître tous les ıts qui sont liés à la « pathogénie » des bactéries.

Quoi qu'il en soit, l'intensité d'action du Bactériophage est parfois lement brutale que bien des bactériologues ont dû se trouver au urs de leurs recherches, en présence de phénomènes provoqués par ı et qui sont restés pour eux incompréhensibles. On m'a rapporté, r exemple, qu'on avait constaté à plusieurs reprises dans le laboraıre de Haffkine que des cultures de bacilles pesteux en bouillon clarifiaient, le milieu devenant parfaitement limpide, en l'espace

de quelques heures. Ne sachant à quoi attribuer ce curieux phénomène, on parlait de cultures « qui se suicidaient ». Le Bactériophage était certainement en cause.

Voici un autre fait du même ordre ELIAVA ayant été chargé d'examiner l'eau de la rivière Koura, qui passe à Tiflis, constata le phénomène suivant : il additionnait l'eau suspecte d'une solution de peptone; après quelques heures d'incubation, un échantillon prélevé près de la surface montrait au microscope de très nombreux vibrions de forme normale ; un réensemencement sur gélose lui donnait après incubation un léger dépoli et le microscope montrait également qu'il s'agissait d'une culture de vibrions. Une douzaine d'heures plus tard, tant en eau peptonée que sur gélose, toute trace de vibrions avait disparu. L'expérience répétée de nombreuses fois lui donna toujours le même résultat; il lui fut impossible d'obtenir en culture le Vibrion qui commençait à se développer, mais qui disparaissait peu d'heures après. Le phénomène resta pour lui inexplicable jusqu'au jour où il eut connaissance des Communications touchant le Bactériophage.

En somme, il est certain qu'un grand nombre de bactériologues ont accidentellement constaté qu'un phénomène étrange se produisait parfois dans une culture en milieu liquide ou solide, seulement, aucun n'a eu l'intuition qu'il se trouvait en présence d'un phénomène important, et n'en a par conséquent poursuivi l'étude.

EXPÉRIENCE FONDAMENTALE

Voici l'expérience qui a servi de point de départ aux recherches qui vont être exposées.

Un sujet adulte, atteint de dysenterie grave à Bacille de SHIGA, était en traitement à l'hôpital Pasteur. Je prélevais journellement une dizaine de gouttes de ses déjections que j'introduisais dans un tube de bouillon. Après une nuit à l'étuve, l'émulsion était filtrée sur bougie Chamberland. A un nouveau tube de bouillon, préalablement ensemencé avec le Bacille dysentérique de SHIGA, j'ajoutais une dizaine de gouttes du filtrat, puis je le plaçais à l'étuve. Tant que dura la maladie, tous les tubes préparés chaque jour de la même manière, donnèrent une culture normale de bacilles dysentériques. Un jour, le tube préparé la veille resta stérile : renseigne-

ments pris, le malade présentait une amélioration notable, rapidement suivie d'une franche convalescence.

Au bouillon ensemencé et additionné de filtrat, resté en apparence stérile, j'ajoutai une émulsion de bacilles de SHIGA, provenant d'une culture jeune sur gélose, de manière à obtenir un louche franc. Le tube fut placé à l'étuve : après une douzaine d'heures il était limpide

Les déjections ayant servi à préparer le filtrat contenaient donc un principe qui dissolvait le Bacille dysentérique

J'ajoutai alors une goutte de la culture lysée, à une culture récente en bouillon de bacilles de SHIGA : une quinzaine d'heures plus tard la culture était lysée à son tour J'effectuai de même plusieurs passages successifs, introduisant chaque fois une goutte de la culture précédemment lysée dans une nouvelle culture de bacilles de SHIGA : l'action, loin de diminuer d'intensité, s'exaltait à chaque passage ; la lyse s'obtenant de plus en plus rapidement.

Le principe lytique provenant des déjections était donc cultivable en série.

Additionnant une culture jeune de bacilles de SHIGA en bouillon d'une quantité très faible d'une de ces cultures lysées, soit un cent millième de centimètre cube, et étalant de suite, puis après une, deux, trois heures d'étuve, une goutte de cette culture sur des tubes de gélose inclinée, j'obtins, après incubation, des cultures présentant des particularités intéressantes. Dans le premier tube, la surface de la gélose était recouverte d'une couche normale de bacilles dysentériques, mais avec deux plages circulaires, d'environ 2 mm. de diamètre, nues, sans trace de culture apparente. Le second tube de gélose, ensemencé 1 h. après le début de l'action, présentait six de ces plages ; dans le troisième il y en avait une centaine, enfin la gélose du quatrième ne portait aucune culture apparente.

J'avais donc une nouvelle preuve que le principe lytique se multipliait réellement et de plus que ce principe était condensé sous forme de particules actives. L'élément, origine du phénomène de la lyse, étant constitué par des masses qui se déposent sur la gélose en des points définis, chaque masse étant susceptible de se multiplier (puisque, indépendamment de l'action en série, elle donne naissance à une colonie), ne pouvait être autre chose qu'un ferment figuré, un être vivant, parasite des bactéries ; on ne peut en effet se représenter un ferment soluble, une diastase, se multipliant sous forme de granulations concentrant leur action sur des points définis.

Comme on le verra au cours de cet ouvrage, toutes les expérien-:es, sans une exception, concordent pour montrer qu'il s'agit d'un nicrobe, et même d'un microbe qui présente toutes les caractéristi-ques principales des microbes, y compris la fixation du complément sous l'influence d'un sérum anti

En employant le mot « microbe », ou mieux « ultramicrobe ». uivant l'heureuse expression de CALMETTE, je donne à ce mot son ens réel de « petit être vivant », sans aucune présomption sur le ègne auquel il peut être rattaché Est ce une bactérie, un proto-:oaire, un champignon? Je l'ignore, ses dimensions sont trop rédui-es pour qu'on puisse espérer résoudre la question par l'observation lirecte au moyen des instruments optiques actuels. Serait-ce même ine cellule infiniment petite, un organite, provenant d'un organisme upérieur, cellule indéfiniment cultivable en série *in vitro* aux lépens des bactéries et se comportant dès lors comme un être auto-iome? C'est peu probable, mais nous n'avons toutefois pas le droit le rejeter *a priori* aucune conception s'accordant avec le fait, lémontré par l'expérience, que le principe lytique, que j'ai dénommé *Bacteriophagum intestinale* ou Bactériophage, est une particule qui se multiplie aux dépens de la substance des bactéries, capable par conséquent d'assimilation, et qui est indéfiniment cultivable en érie, *in vitro*, sous sa forme filtrante Je dis qu'il s'agit d'un être ivant parce que l'assimilation et la reproduction sont précisément es caractéristiques de la vie

Je terminerai cette entrée en matière par un mot au sujet du erme « Bactériophage » qui a été critiqué. Je n'ai évidemment pas pris le suffixe « phage » dans son sens strict de manger, mais dans celui de « se développer aux dépens de », sens qu'il a d'ailleurs réquemment dans la terminologie scientifique. Certains protozoai-res, par exemple, sont parasités par la chitridinée « nucleophaga », qui se développe à l'intérieur du noyau C'est exactement le même sens qu'il faut donner au terme « phage » dans le mot « Bactério-phage »

CHAPITRE PREMIER

LA BACTÉRIOLYSE

Technique de l'isolement du Bactériophage Exaltation de la virulence. Technique de la numération des ultramicrobes bactériophages. Multiplication aux dépens des bactéries, en milieux liquides Le Bactériophage est un parasite obligatoire. Influence de l'état de la bactérie Influence du milieu. Culture sur milieux solides colonies isolées Influence de la concentration du milieu en bactéries Action nocive des produits de sécrétion du Bactériophage Influence des conditions physiques extérieures. Influence des antiseptiques. Substances bactériennes solubilisées. L'ultramicrobe bactériophage · parasite interne La bactériolyse au microscope.

TECHNIQUE DE L'ISOLEMENT DU BACTÉRIOPHAGE

Tout laboratoire de bactériologie possède le matériel nécessaire pour l'isolement et la culture du Bactériophage. Un appareil à filtration sur bougie est indispensable : j'ai toujours employé le modèle de MARTIN, avec bougies CHAMBERLAND L2 ou L3. Comme milieux de culture : du bouillon peptoné et du bouillon gélosé à 2 o/o

On peut avoir à rechercher la présence d'un Bactériophage actif dans des matières qui requièrent un traitement préalable, par suite de leur état physique qui ne se prête pas à la filtration sur bougie.

1° Il s'agit d'un liquide stérile, au sens actuel du mot (1), par

(1) Dans le cours de cet ouvrage je me trouverai fréquemment gêné dans l'exposition des faits, faute d'expressions appropriées à certains états. Je dénommerai « stérile » un milieu ne renfermant aucun microbe visible au microscope, ou cultivable dans un milieu artificiel, et « ultrastérile » un milieu ne contenant pas d'ultramicrobes. Un produit renfermant le virus de la rougeole, par exemple, est stérile mais non pas ultrastérile, puisque, s'il est vrai qu'il ne contient rien de visible ou de cultivable, il peut toutefois

exemple du sang, ou d'un liquide organique prélevé aseptiquement. Aucun traitement n'est nécessaire.

2° La matière sur laquelle s'effectue la recherche est un liquide limpide non stérile : on le filtre sur bougie pour le débarrasser des bactéries ; le Bactériophage passe dans le filtrat.

3° C'est un milieu présentant un trouble homogène : une culture bactérienne, par exemple. La filtration directe provoquerait la colmatation rapide de la bougie, il faut donc au préalable dégrossir le liquide : voici le procédé le plus efficace

Prendre un entonnoir garni d'un filtre plissé assez grand pour recevoir en une fois tout le liquide à filtrer, verser dans un verre de l'eau ordinaire, y ajouter une pincée de terre d'infusoires, bien agiter et verser d'un seul coup sur le filtre Une fois l'eau écoulée on obtient un fin revêtement de terre d'infusoires qui tapisse la surface du filtre. Filtrer alors le liquide en essai, qui est ensuite passé à la bougie.

4° Il s'agit, ou d'un liquide tenant en suspension des particules organiques, ou d'une matière plus ou moins solide, ce sera le cas le plus fréquent : déjections plus ou moins liquides, pâteuses ou solides, fumier plus ou moins mélangé de terre ; débris d'organes, etc Il y a lieu de désagréger aussi parfaitement que possible le matériel à examiner

Le procédé le plus simple consiste à émulsionner soigneusement la matière dans du bouillon, à raison de 2 à 5 g pour 50 cm³, placer cette émulsion à l'étuve à 37° pendant 12 à 18 h. les fermentations, qui s'effectuent sous l'influence de la culture des diverses bactéries qui souillent le milieu, produisent une désagrégation suffisante. Au sortir de l'étuve il ne reste plus qu'à opérer comme dans le cas précédent filtration sur terre d infusoires puis sur bougie

Si la matière en expérience renfermait un Bactériophage, ce Bactériophage se trouve dans le filtrat

Deux cas peuvent alors se présenter :

A. Recherche d'un Bactériophage actif contre une bactérie donnée.

transmettre la rougeole Un milieu qui contient des ultramicrobes bactériophages est également stérile au sens bactériologique actuel du mot, puisqu'il est limpide et que le germe qu'il renferme ne se cultive dans aucun milieu artificiel, mais il n'est pas ultrastérile car il contient un principe qui se cultive aux depens des bactéries, comme le virus rougeoleux se cultive aux dépens d'organismes supérieurs.

B. Recherche de l'activité du Batériophage, soit contre diverses bactéries, soit contre une ou des bactéries indéterminées.

A. Le premier cas est le plus simple, examinons-le tout d'abord et prenons comme exemple la recherche d'un Bactériophage actif contre le Bacille dysentérique de SHIGA.

Nous avons ensemencé la veille avec ce bacille un tube de gélose inclinée ; en partant de cette culture jeune nous ensemençons trois tubes de bouillon peptoné (1)

On ajoute dans le premier tube une goutte du filtrat, dix dans le second, 2 cm³ dans le troisième. Un tube simplement ensemencé avec le bacille dysentérique sert de témoin. Ces tubes sont placés à l'étuve à 37°. Après 12-18 h., trois cas peuvent se présenter : les trois tubes se sont troublés par suite d'une culture du bacille dysentérique, un ou deux seulement des trois tubes se sont troublés, les trois tubes sont restés limpides.

1° Les trois tubes sont troubles . il faut bien se garder d'en conclure qu'il y a absence du Bactériophage actif, car, en ne prenant comme critérium de sa présence que la lyse des bactéries, il passerait la plupart du temps inaperçu. La lyse ne représente qu'un fait spécial au milieu d'un ensemble de phénomènes fort complexes.

Les trois tubes étant troubles, prélever environ 1/50 de cm³ de chacune des trois cultures, au moyen d'une boucle de platine, et l'étaler à la surface de trois tubes de gélose inclinée. Après incubation, si ces tubes présentent une culture normale de bacilles dysentériques, la recherche est négative : le matériel primitif ne contenait pas de Bactériophage actif contre le bacille dysentérique de SHIGA.

La présence d'un Bactériophage actif est indiquée par l'aspect anormal de la nappe bacillaire qui s'est développée sur la gélose : suivant le nombre des ultramicrobes bactériophages, cet aspect varie. La couche de bacilles peut présenter une ou plusieurs plages circulaires, où la surface de la gélose est nue, sans trace de culture apparente ; la couche bacillaire peut présenter un aspect déchiqueté, corrodé, par suite de la confluence des plages ; il peut même ne rester que quelques lambeaux de culture ou des colonies isolées ;

(1) Comme on le verra plus loin ce bouillon doit être alcalin du bouillon ordinaire des laboratoires (j'ai toujours employé de préférence le bouillon MARTIN) neutralisé puis additionné de 6 cm³ de solution normale de soude par litre, convient parfaitement; c'est d'ailleurs le degré d'alcalinité le plus fréquemment employé en bactériologie.

enfin si le nombre des ultramicrobes est encore plus considérable, la gélose peut rester vierge de toute culture apparente.

Comme nous le verrons, chaque souche du Bactériophage possède une virulence propre, le mot virulence étant pris dans son sens réel, c'est-à-dire « d'aptitude à se développer aux dépens de l'être parasité ». Certaines souches du Bactériophage se multiplient très rapidement, d'autres ne végètent que lentement : les premières jouissent d'une grande virulence vis-à-vis de la bactérie qu'on lui a fournie pour se développer, les secondes ne possèdent qu'une virulence faible. Nous aurons d'ailleurs à revenir sur cette notion de la virulence du Bactériophage qui sera traitée en détail dans un chapitre spécial. Je ne fais ici que la signaler rapidement pour donner la raison de la diversité d action des différentes souches du Bactériophage que l'on constate lors de l'isolement. Le diamètre des plages, essentiellement variable suivant les souches du Bactériophage, depuis une fraction de millimètre (la couche bactérienne paraît comme parsemée de piqûres d'aiguilles), jusqu à 4 à 5 mm., donne une mesure de la virulence · plus les plages sont étendues, plus le Bactériophage est virulent Nous verrons que quelle que soit la virulence d'une souche du Bactériophage au sortir de l'organisme, il est possible de l'exalter *in vitro*.

2° Le ou les deux premiers tubes seuls ont donné une culture de bacilles dysentériques le filtrat contenait un Bactériophage d'une activité moyenne ou forte On n'a qu'à opérer comme dans le cas suivant pour obtenir les plages sur gélose.

3° Les trois tubes sont restés limpides . on se trouve en présence d'un Bactériophage extrêmement actif La vérification est simple : prendre trois tubes de bouillon, y ajouter une émulsion de bacilles jeunes, provenant d'une culture sur gélose, de manière à obtenir un léger louche, introduire dans chacun de ces tubes une goutte du liquide prélevée respectivement dans chacun des trois tubes restés limpides, agiter, puis répartir immédiatement une boucle de chacune de ces trois émulsions à la surface d'autant de tubes de gélose inclinée. Placer à l'étuve Après 12-18 h., les trois tubes d'émulsion seront à leur tour limpides et sur les trois tubes de gélose on aura les cultures caractéristiques décrites précédemment.

J'ai pris le Bacille dysentérique de Shiga comme exemple : quelle que soit la bactérie vis-à-vis de laquelle on veuille rechercher un Bactériophage actif, la technique de l'isolement reste semblable, il suffit d'ensemencer le milieu avec la bactérie en cause ; si l'on

:cherche par exemple un Bactériophage actif pour le Bacille pesteux, faudra ensemencer les tubes de bouillon avec le Bacille pesteux

B Au lieu de rechercher si une matière renferme un Bactério-iage actif pour une bactérie donnée, on peut se proposer de véri-:r s'il s'y trouve un Bactériophage doué d'activité vis-à-vis de plu-eurs bactéries à la fois Il suffira de préparer autant de séries de ois tubes qu'il y aura de bactéries vis-à-vis desquelles se fera la cherche.

Soit à rechercher l'activité du Bactériophage intestinal vis-à-vis :s Bacilles dysentériques de SHIGA, de FLEXNER et de HISS, du typhique et du *B. coli*. On préparera cinq séries de trois tubes : première série sera ensemencée avec le Bacille de SHIGA, la conde avec le Bacille de FLEXNER, la troisième avec le Bacille de iss, la quatrième avec le Bacille typhique, la cinquième avec le *coli*. Dans le premier tube de chacune des cinq séries on ajou-ra une goutte du filtrat, dans le second dix gouttes, dans le oisième 2 cm^3 et l'on opérera avec chaque série comme je l'ai diqué en détail pour la série SHIGA.

Pour les recherches courantes on pourra n'employer qu'un seul be au lieu de trois, on y ajoutera dix gouttes de filtrat. Le seul sque de ce procédé simplifié, c'est de laisser passer inaperçu un ictériophage doué d'activité très faible (1).

1) Je dois faire ici une remarque au sujet d'un procédé indiqué par RDET et CIUCA et sur lequel ces auteurs ont d'ailleurs basé leur théorie de lyse héréditaire. Ils inoculent, à trois ou quatre reprises différentes, à elques jours d'intervalle, une culture de *Bacille coli* dans la cavité périto-ıle d'un cobaye ; le lendemain de la dernière injection il suffirait, d'après :, de laver la cavité péritonéale le principe faisant naître « l'hérédité à la e » se trouverait dans le liquide Il ressort de leur première communica-n qu'ils considéraient qu'il s'agissait là d'un fait d'ordre général, ce qui lleurs était une des conditions *sine qua non* de l'exactitude de leur théorie ıne injection d'une bactérie quelconque, l'organisme devait répondre par production d'un principe qui donnait naissance au phénomène de la lyse série, ils annonçaient qu'ils feraient prochainement connaître les résul-s obtenus avec diverses bactéries La communication annoncée n'a jamais u. J'ai essayé vainement de reproduire l'expérience décrite par BORDET CIUCA et je sais que de nombreux chercheurs ont éprouvé le même mécompte réalité, dans cette expérience, il y a eu passage du Bactériophage anti-i, qui se trouvait naturellement dans l'intestin du cobaye mis en expé-nce, dans la cavité péritonéale à la faveur de l'irritation produite par ioculation ; puis culture dans la cavité même aux dépens des bacilles *coli*

TECHNIQUE DE L'EXALTATION DE LA VIRULENCE

Nous avons vu que le Bactériophage peut être présent sans qu'il y ait pourtant la plus légère apparence de lyse de l'émulsion bactérienne, c'est même le cas le plus fréquent lors de l'isolement. Il est, en général, facile d'exalter l'activité d'un tel Bactériophage par l'un des procédés suivants.

Quand l'ensemencement sur gélose a montré qu'il existait un Bactériophage actif dans l'émulsion en bouillon, on filtre cette émulsion sur terre d'infusoires, puis sur bougie. On prépare une émulsion faiblement louche de la bactérie vis-à-vis de laquelle le Bactériophage s'est montré actif et on y introduit quatre à cinq gouttes du filtrat Après un séjour de 24 h. à l'étuve à 37°, si la lyse ne s'est pas produite, on filtre cette seconde émulsion à la terre d'infusoires puis sur bougie, et on introduit quatre à cinq gouttes de ce nouveau filtrat dans une troisième émulsion légère de la bactérie. On continue ainsi les passages jusqu'à ce qu'on obtienne la lyse. Il est d'autre part facile, lors de chaque passage, de vérifier si la virulence du Bactériophage augmente . il suffit d'étaler sur gélose inclinée une goutte de l'émulsion ; la comparaison des cultures obtenues à chaque passage renseigne sur l'état de la virulence. Par exemple la culture sur gélose obtenue avec l'émulsion du premier passage présente une couche bactérienne avec dix petites plages ; avec l'émulsion du second passage, cent plages ; avec celle du troisième, une couche bactérienne déchiquetée par suite de l'abondance des plages ; avec celle du quatrième, quelques colonies bactériennes isolées : on se rend compte que la virulence du Bactériophage, c'est-à-dire sa faculté de se développer aux dépens de la bactérie, augmente à chaque passage et l'on peut être sûr qu'on finira par obtenir la lyse de l'émulsion.

inoculés Ce qui démontre l'exactitude de cette interprétation, c'est que l'expérience donne le résultat annoncé par BORDET et CIUCA, si l'on a pris soin, quelques heures avant l'injection intrapéritonéale de culture bactérienne, d'administrer à l'animal, *per os*, une culture d'une souche de Bactériophage actif pour la bactérie injectée. Le Bactériophage actif se trouvant dans l'intestin, passe dans la cavité péritonéale Le procédé de BORDET et CIUCA ne donne donc accidentellement de résultat positif que si le Bactériophage actif se trouve préalablement dans l'intestin Toutes les conclusions de ces auteurs tombent *ipso facto*.

On peut encore pratiquer les passages successifs sur gélose incli-
iée. On prend le tube présentant des plages, avec un fil de platine
on prélève la culture bactérienne en bordure d'une plage et on l'en-
semence à la surface d'un tube de gélose stérile ; on fait un second
ensemencement semblable au premier, en partant d'une plage
située sur la culture de ce second tube, puis un troisième, un qua-
rième, et ainsi de suite. Quand on n'a plus que des fragments de cul-
ure épars sur la gélose, on lave soigneusement la surface du dernier
ube avec du bouillon que l'on filtre ensuite sur terre d'infusoires,
uis sur bougie Dans le filtrat on a souvent un Bactériophage déjà
uffisamment actif pour provoquer la lyse d'une émulsion en
ouillon.

Comme nous le verrons, le Bactériophage n'est détruit qu'à 65°
., c'est-à-dire à une température supérieure à la température mor-
elle pour la plupart des bactéries non sporulées On peut donc
emplacer la filtration par un chauffage d'une demi-heure à 58-60°
ui tue les bactéries et respecte le Bactériophage. Je préfère la
iltration qui m'a toujours paru donner de meilleurs résultats.

J'indiquerai dans le chapitre suivant, au paragraphe intitulé
« Cultures multiples », un troisième procédé.

On peut enfin, dans certains cas, exalter la virulence du Bacté-
iophage *in vivo*. On fait ingérer à un cobaye 2 cm³ du filtrat conte-
iant le Bactériophage à exalter ; d'autre part on introduit dans le
éritoine de l'animal quelques centimètres cubes de la culture de la
actérie vis-à-vis de laquelle le Bactériophage est actif. Après
2-18 h. on injecte de nouveau dans le péritoine 10 cm³ de bouillon sté-
ile ; puis, quelques minutes après, on prélève avec un trocart l'ex-
udat péritonéal que l'on recueille dans un tube renfermant quelques
entimètres cubes d'eau citratée. Après quelques heures d'étuve, on
iltre sur terre d'infusoires puis sur bougie : on obtient souvent
ans le filtrat un Bactériophage sensiblement plus virulent que celui
ui a été ingéré par le cobaye.

NUMÉRATION DES ULTRAMICROBES BACTÉRIOPHAGES

Une trace d'un filtrat renfermant un Bactériophage *très actif*
ontre une bactérie donnée, introduite dans une émulsion en bouil-
on de cette bactérie, provoque en l'espace de quelques heures la

lyse des bactéries : le milieu devient aussi limpide que du bouillon non ensemencé. Une trace de l'émulsion lysée, introduite dans une nouvelle émulsion semblable à la première, provoque également la lyse des bactéries ; une trace de cette seconde émulsion devenue limpide, introduite dans une troisième, reproduit le même phénomène et ainsi de suite. J'ai, pendant plus de trois ans, effectué avec une même souche des passages journaliers, parfois même deux et jusqu'à trois passages dans la même journée, introduisant à chaque passage environ un millième de centimètre cube du dernier tube lysé dans le tube d'émulsion suivante, et après plus de 1.500 passages l'émulsion lysée du dernier tube était aussi active, et même plus active, que le filtrat ayant servi à déclancher le phénomène dans le premier tube de la série.

Une émulsion une fois lysée ne renferme plus aucune bactérie vivante, par contre la quantité d'ultramicrobes bactériophages introduite pour amorcer la lyse s'est augmentée, puisque le nouveau lysat est aussi actif que le précédent ; l'émulsion lysée est devenue ce que l'on peut appeler, au sens strict du mot, une culture du Bactériophage.

Nous avons vu précédemment que l'ensemencement sur gélose d'une émulsion bactérienne à laquelle on venait d'ajouter une petite quantité d'un liquide contenant le principe actif, donnait une culture bactérienne parsemée de plages : cette observation va nous permettre de suivre de plus près le phénomène de la multiplication des ultramicrobes, puisque chaque plage représente indubitablement l'endroit où, pendant l'étalement, s'est déposé un élément actif, soit un ultramicrobe. Il nous suffit d'opérer sur des quantités mesurées pour savoir le nombre de germes actifs existant dans un liquide.

Je prends au hasard, dans un cahier d'expériences, une numération à titre d'exemple.

Pour éviter les répétitions inutiles, je préciserai d'abord ce qu'il faudra entendre par « émulsion de bacilles de SHIGA », sans autre indication.

On prépare, une fois pour toutes, par les procédés connus, une série de tubes étalons contenant des émulsions titrées à 100, 200, 250, 300 et 400 millions de bacilles de SHIGA par cm^3 ; ces émulsions sont stabilisées par l'addition d'une petite quantité de formol ; les tubes qui les renferment sont ensuite scellés au chalumeau.

L'émulsion destinée à la lyse doit être préparée de préférence avec des bacilles provenant d'une culture jeune sur gélose inclinée.

On prépare d'abord une émulsion concentrée, en introduisant dans le tube 1 ou 2 cm³ de bouillon, on incline pendant quelques minutes de manière à ce que la couche bacillaire soit complètement recouverte de liquide, puis on agite : l'émulsion est parfaite. On prélève avec une pipette une certaine quantité de cette émulsion concentrée et on la verse, goutte à goutte, dans un tube de bouillon jusqu'à ce que l'opacité soit plus forte que celle du tube étalon à deux cents millions et plus faible que celle du tube à trois cents. L'approximation est suffisante dans la pratique courante : on a une émulsion qui renferme environ deux cent cinquante millions de bacilles par centimètre cube de milieu. C'est cette émulsion que je prendrai pour type On peut également employer une culture jeune en bouillon : je préfère l'émulsion qui se prête mieux à une concentration déterminée

Exp. I — Un tube contenant 10 cm³ d'émulsion de bacilles de Shiga est additionnée de 1/50 000 de cm³ d'une culture de Bactériophage âgée de 10 jours, c'est-à-dire d'une émulsion de Shiga lysée depuis 10 jours Le tube est agité pour répartir uniformément la semence ; je prélève de suite, au moyen d'une fine boucle de platine tarée, 1/100 de cm³ de l'émulsion que je répartis le plus uniformément possible, par frottements, à la surface de la gélose d'un tube incliné. Ce tube est placé à l'étuve à 37°. Après 18 h il présente une culture de Shiga parsemée de 51 plages

Le calcul est simple . les 10 cm³ d'émulsion ont reçu 1/50.000 de cm³ de culture de Bactériophage, soit 1/500.000 de cm³ pour chaque centimètre cube d'émulsion. J'ai prélevé 1/100 de cm³ qui contenait donc 1/50 000.000 de cm³ de la culture de Bactériophage ; ce 1/100 de cm³ étalé sur la gélose a donné 51 plages, soit 51 colonies provenant chacune d'un germe bactériophage déposé pendant l'étalement. 51 germes pour 1/50.000 000 de cm³ représentent 2.550.000 000 de germes par centimètre cube : c'est ce que contenait donc la culture du Bactériophage qui a servi à ensemencer l'émulsion.

La technique de la numération des ultramicrobes bactériophages ne diffère guère, comme on peut s'en rendre compte, de celle des bactéries ordinaires ; pour ces dernières on obtient des colonies isolées sur une surface par ailleurs stérile, pour les ultramicrobes on obtient des plages représentant des colonies parsemant une couche bactérienne. Il ne peut en être autrement puisque l'ultramicrobe bactériophage ne peut se développer qu'aux dépens des bactéries qui constituent son milieu de culture.

Chaque plage représente bien une colonie de Bactériophages, car, si l'on en touche le centre avec la pointe effilée d'une pipette, et si l'on trempe cette pointe dans une émulsion de bacilles dysentériques, cette émulsion, étalée sur gélose, reproduit les plages caractéristiques ; de plus elle-même se lyse en l'espace de quelques heures. La plage, en apparence stérile, était donc bien en réalité une colonie d'ultramicrobes bactériophages.

MULTIPLICATION DES ULTRAMICROBES BACTÉRIOPHAGES

La méthode de numération va nous permettre de suivre de plus près la multiplication des germes bactériophages au cours de l'action.

Pour une même émulsion de bacilles de Shiga, toujours à 250 millions par centimètre cube, deux cas extrêmes sont surtout intéressants à considérer l'inoculation (1) avec de nombreux germes bactériophages, l'inoculation avec un minimum de germes . un ou deux seulement.

1° Inoculation massive. — 10 cm³ d'émulsion de bacilles de Shiga sont inoculés avec 1/25 de cm³ d'une culture du Bactériophage contenant trois milliards de germes par centimètre cube. On place le tube d'émulsion à l'étuve Observé macroscopiquement de temps à autre, on voit que le trouble se maintient à peu près constant jusqu'à la troisième heure (2), à partir de ce moment le liquide s'éclair-

(1) Comme je l'ai déjà fait remarquer, l'étude du Bactériophage présente une extrême complexité du fait que nous avons toujours à considérer les actions et réactions mutuelles de trois facteurs variables : milieu, bactérie, Bactériophage, et cette complexité rend parfois difficile l'exposé des faits par crainte d'équivoque, faute de mots appropriés Ici, par exemple, comment appeler l'acte d'introduire une certaine quantité d'une culture du Bactériophage dans une culture bactérienne ? Je pourrais évidemment employer le terme « ensemencement » mais le milieu a déjà été ensemencé avec la bactérie, et dans certains cas il pourrait y avoir équivoque Le terme propre serait « contamination », malheureusement ce terme a pris en bactériologie un sens précis, synonyme de souillure Je choisis donc le terme « inoculation » J'ensemencerai donc un milieu avec une bactérie, puis j'inoculerai la culture avec le Bactériophage

(2) On observe assez souvent, sans que j'aie d'ailleurs encore pu fixer exactement les conditions d'apparition du phénomène, que la dissolution des bacté-

it peu à peu : entre la quatrième et la sixième heure à partir du ioment de l'inoculation, il est devenu limpide.

Je prélève, immédiatement après l'inoculation, et ensuite à intervalles réguliers au cours des 6 h., une boucle du liquide que j'étale ur gélose · tous les tubes restent stériles. On serait tenté de croire ue l'absence de toute colonie de SHIGA tient au fait que tous les acilles ont été tués dès le premier contact avec la culture du Bactériophage inoculée : il n'en est rien, car, si au lieu d'ensemencer sur élose l'émulsion telle quelle, on la dilue au préalable au millième ans du bouillon, cette dilution étalée sur gélose donne naissance à e nombreuses colonies de bacilles de SHIGA Les bacilles n'étaient onc nullement tués ; si l'étalement direct sur gélose de l'émulsion st resté stérile, c'est qu'on a ensemencé en même temps et des acilles de SHIGA vivants et des germes bactériophages en très grand ombre. Les bacilles ont bien commencé à se multiplier sur le ilieu nutritif, mais les ultramicrobes bactériophages ne sont pas estés inactifs, trouvant des bacilles à leur portée ils les ont parasité, se sont reproduits et ont empêché toute culture bacillaire. Au ontraire, pendant l'étalement de l'émulsion diluée au millième, les acilles et les germes bactériophages, mille fois moins nombreux, se ont trouvés séparés par des espaces suffisamment grands pour u'une interaction ne fut plus possible, ce qui a permis aux bacilles ui ne se trouvaient pas au voisinage immédiat d'un ultramicrobe le se multiplier et de former des colonies.

Une seconde dilution au millième de l'émulsion, après que celle-i est restée pendant 1 h. à l'étuve, étalée sur gélose, reste le lus souvent stérile ou ne donne naissance qu'à de très rares colonies ; après 2 h. la gélose reste toujours stérile : tous les bacilles ontenus dans l'émulsion étaient donc à ce moment attaqués, et ucun n'a pu se reproduire.

2° ENSEMENCEMENT A L'UNITÉ. — Six tubes d'émulsion de bacilles le SHIGA sont inoculés avec une dilution telle d'une culture du Bactériophage (renfermant trois milliards d'ultramicrobes par centimètre cube), que chaque tube en reçoit un six milliardième de

nes est précédée d'une agglutination très nette. On observe surtout ce phénomène quand on inocule l'émulsion bactérienne avec une quantité relativement levée (une dizaine de gouttes, par exemple) d'une culture d'un Bactériophage le virulence moyenne

centimètre cube. Placés à l'étuve, quatre donnèrent une culture normale de bacilles dysentériques, tous les étalements sur gélose fournirent des cultures normales : ces quatre tubes n'avaient donc reçu aucun ultramicrobe bactériophage, nous ne nous en occuperons pas.

Les deux autres tubes, qui avaient reçu chacun probablement un, certainement pas plus de deux ultramicrobes, présentèrent l'aspect suivant. L'émulsion devint de plus en plus trouble · après 2 h. à l'étuve l'opacité de l'émulsion était environ deux fois plus forte qu'au début, après 3 h., deux fois et demi; après 4 h. trois fois; elle commence alors à s'éclaircir, après 5 h. elle est deux fois ce qu'elle était au début, l'éclaircissement se poursuivant ensuite peu à peu pour devenir à peu près total après 14 h.

Immédiatement après l'inoculation du Bactériophage, puis de demi-heure en demi-heure, 1/50 de cm³ fut prélevé de chacune de ces deux émulsions et étalé sur gélose inclinée ; après incubation, le résultat fut le suivant :

étalements effectués après 1/2, 1, 1 1/2 et 2 h, couche normale de bacilles de SHIGA sur la gélose ;

après 2 h 1/2 : 3 plages sur un tube, 5 sur l'autre, moyenne 4. Après 2 h. 1/2 l'émulsion inoculée avec un ultramicrobe bactériophage en contient donc alors 2.000,

après 3 h. : 5 plages et 4 plages. Aucun accroissement entre 2 h. 1/2 et 3 h. ;

après 3 h. 1/2 : 9 et 5 plages, moyenne 7 ; le nombre d'ultramicrobes n'a guère augmenté ;

après 4 h. : 101 et 111 plages ; moyenne 105. L'émulsion contient donc après 4 h. de 50.000 à 60.000 ultramicrobes bactériophages ;

après 4 h. 1/2 . 145 et 160 plages, moyenne 152 ; soit pour l'émulsion 75 000, chiffre peu différent du précédent ;

après 5 h., les géloses sont stériles. Une dilution au millième dans une émulsion de SHIGA, étalée de la même manière sur gélose, donne 4 et 6 plages. L'émulsion après 5 h. contient par conséquent plus de 1 500 000 ultramicrobes bactériophages.

La multiplication des ultramicrobes bactériophages est donc extrêmement rapide et, ce qui est remarquable, se produit par à-coups successifs, chaque accroissement étant séparé par un intervalle de temps d'environ 75 minutes Nous aurons d'ailleurs à revenir sur cette expérience quand nous étudierons le mode de reproduction du Bactériophage.

L'expérience montre de plus qu'il suffit de la présence d'un seul ultramicrobe dans une émulsion bactérienne, pourvu qu'il provienne d'une souche au maximum d'activité, pour que la lyse des bactéries soit totale.

Inutile de dire que ces expériences ont été renouvelées un grand nombre de fois, toujours avec un semblable résultat, il en a été d'ailleurs de même pour chacune des expériences relatées dans cet ouvrage Je désire attirer l'attention des expérimentateurs sur un point important : du moment qu'il s'agit d'une souche du Bactériophage suffisamment virulente, le résultat final de l'expérience est le même, sans aucune exception : accroissement du nombre des ultramicrobes inoculés et lyse totale de l'émulsion bactérienne En répétant plusieurs fois la même expérience avec la même souche de Bactériophage, en se plaçant naturellement toujours dans les mêmes conditions de milieu et de température, la multiplication des ultramicrobes se produit sensiblement de la même manière et la lyse s'effectue dans le même temps, mais si l'on étudie comparativement des souches différentes, quoique toutes douées d'une grande activité, on observe alors des différences notables : avec telle souche on obtiendra la lyse totale après 3 h. 1/2 (c'est le minimum que j'aie observé), avec telle autre seulement après 14 h., toutes les conditions étant égales. En un mot, et cette observation s'applique à toutes les expériences exposées au cours de cet ouvrage, le phénomène se produira toujours comme je l'indique, les temps seuls pourront varier : l'ultramicrobe bactériophage est un être vivant et comme tel, les actions qu'il produit ne peuvent avoir la régularité d'une action diastasique

Exp — Voici, à titre d'exemple, une expérience réalisée avec une autre souche du Bactériophage on va voir que la lyse s'est produite en un temps beaucoup plus court que dans les expériences ci-dessus.

Emulsion de Shiga dans du bouillon préalablement chauffé à 38° Inoculation avec 1/10.000 de cm³ de culture du Bactériophage,

après 2 h. émulsion 3 fois plus trouble qu'au début ;
après 2 h 1/2, trouble environ 3 1/2 fois plus fort qu'au début,
après 2 h 45, trouble environ 3 fois plus fort qu'au début,
après 3 h. louche extrêmement léger.

Dans cette expérience la lyse s'est donc presque totalement effectuée en l'espace de quinze minutes, entre 2 h. 45 et 3 h. après l'inoculation.

Un seul ultramicrobe bactériophage est donc suffisant pour pro-

voquer la lyse ; si nous effectuons des dilutions successives, en ensemençant, par exemple, une goutte d'une culture du Bactériophage dans un tube de bouillon stérile, une goutte de ce premier tube dans un second, une goutte du second dans un troisième, et ainsi de suite ; si ensuite nous introduisons dans chacun de ces tubes une certaine quantité d'une émulsion concentrée de bacilles de SHIGA, on obtiendra la lyse dans tous les tubes qui auront reçu au moins un ultramicrobe, soit ordinairement les quatre premiers de la série, dans les tubes suivants on aura une culture normale de SHIGA. Comme nous avons fait des comptages sur gélose, le fait s'explique de lui-même, mais si l'on se prive de ce moyen d'investigation, on s'expose à commettre une grave erreur et à conclure qu'il y a eu culture des ultramicrobes bactériophages dans du bouillon stérile dans les quatre premiers tubes de la série. Cette erreur a d'ailleurs été commise par certains auteurs. En réalité il y a eu simplement dilution, la dilution restant active tant qu'il s'y trouve un ultramicrobe

Connaissant le nombre d'ultramicrobes dans une émulsion lysée, qui est par le fait même devenue une culture du Bactériophage, et le taux de la dilution, on peut mathématiquement indiquer si la lyse de l'émulsion bactérienne inoculée avec une telle dilution, se produira ou n'aura pas lieu. J'ai effectué cette expérience plus de cent fois avec les souches de Bactériophages les plus diverses.

LE BACTÉRIOPHAGE : PARASITE OBLIGATOIRE

Quel que soit le milieu essayé, en l'absence de la bactérie vis-à-vis de laquelle le Bactériophage est actif, on n'obtient jamais de multiplication des ultramicrobes, et ceci reste encore vrai si, au lieu de bactéries vivantes, on l'inocule dans un milieu quelconque renfermant des bactéries tuées par n'importe quel procédé. J'ai vainement essayé d'obtenir une multiplication en faisant agir le Bactériophage sur des bactéries tuées par vieillissement, par la chaleur, le chloroforme, les essences de thym, de canelle et de moutarde, l'alcool, le bichlorure de mercure, les acides phénique, sulfurique et chlorhydrique, l'iode : on n'obtient aucune action, ni lyse, ni culture des ultramicrobes.

Le Bactériophage est un parasite obligatoire, il ne se multiplie qu'aux dépens de bactéries vivantes.

L'expérience suivante est intéressante en ce qu'elle montre que le Bactériophage n'attaque même que des bactéries normales · les bactéries émulsionnées dans un milieu contenant un antiseptique à dose assez faible pour que les bactéries ne soient tuées qu'après un temps largement suffisant pour permettre la lyse, ne sont nullement touchées et les germes bactériophages ne se multiplient pas. J'ai choisi avec intention un antiseptique n'ayant aucune action sur les diastases le fluorure de Sodium

Dans une solution à 1 o/o de fluorure de Sodium en bouillon, les bacilles de SHIGA sont encore repiquables après 36 h., temps plus que suffisant pour que le Bactériophage ait largement le temps de manifester son action et de se multiplier Or, si l'on effectue des passages dans une telle émulsion, en inoculant le premier tube avec une goutte de culture du Bactériophage, le second, après 24 h. d'incubation, avec une goutte du premier tube; le troisieme avec une goutte du second, et ainsi de suite; on voit que le Bactériophage cesse d'être présent à partir du second ou du troisième tube de la série (ce que l'on vérifie en introduisant une goutte de chaque tube dans une émulsion normale de bacilles). Effectuant d'autre part une série témoin en utilisant du bouillon pur, ou même de l'eau stérile, le Bactériophage cesse également d'être présent dès le troisième ou le quatrième tube, et ce, nous venons de le voir, par suite de la dilution Il n'y a donc pas plus culture des germes bactériophages dans l'émulsion fluorurée qu'il n'y en a dans du bouillon stérile ou dans de l'eau pure.

J'ai d'autre part vérifié que c'était uniquement à cause du milieu dans lequel il était plongé que le bacille n'était plus attaquable : après 24 h. de séjour dans le bouillon fluoruré, si l'on ensemence un tube de bouillon ordinaire avec une goutte de l'émulsion fluorurée, on obtient une culture normale, normalement lysée par le Bactériophage.

Nous aurons à revenir plus tard sur cette expérience, constatons pour le moment que voilà un milieu dans lequel le bacille de SHIGA reste vivant pendant au moins 36 h., dans lequel le Bactériophage reste également vivant, ce milieu n'exerce d'autre part aucune action sur les diastases, et pourtant le Bactériophage ne s'y multiplie pas.

INFLUENCE DE L'ÉTAT DE LA BACTÉRIE

Cette expérience nous conduit à considérer l'influence de l'état de la bactérie sur la lyse. Cette lyse n'est d'ailleurs qu'une conséquence de la multiplication des ultramicrobes et ne peut être totale qu'autant que toutes les bactéries présentes dans l'émulsion soient attaquables.

Au lieu de prendre une émulsion préparée avec une culture jeune, inoculons le Bactériophage dans une culture en bouillon âgée d'une quinzaine de jours; nous obtiendrons bien un éclaircissement du milieu, une lyse partielle, mais le milieu restera louche, et pourtant nous pourrons, en utilisant toujours un tel milieu, effectuer autant de passages que nous voudrons ; un tube quelconque de la série ensemencé sur gélose ou en bouillon restera stérile et une goutte du même tube inoculée dans une émulsion de bacilles jeunes provoquera une lyse parfaite. Le Bactériophage se multiplie donc normalement dans une vieille culture mais ne la lyse pas, ou du moins ne la lyse pas totalement. Quelle en est la raison? Pour le savoir il suffit de comparer le résultat du comptage du nombre total de bacilles existant dans une vieille culture (ce qui peut se faire en employant le procédé au compte-globules), avec le résultat obtenu en effectuant la numération des seuls bacilles vivants (ce qui se fait par ensemencements sur gélose de dilutions titrées). Dans une vérification de ce genre faite sur une culture de bacilles de Shiga en bouillon Martin restée 14 h. à l'étuve puis 15 jours à la température du laboratoire, la numération de la totalité des corps bacillaires donna 625 millions ; celui des seuls bacilles vivants, donc susceptibles de donner naissance à une colonie sur la gélose, fut de 2 millions 1/2 par cm³ de culture. Or nous venons de voir que le Bactériophage ne peut se développer qu'aux dépens de bactéries vivantes qui sont également les seules qui soient lysées. Dans la vieille émulsion dont nous venons de parler, il n'y avait plus qu'un bacille sur 300 environ qui fut susceptible d'être dissous ; on comprend donc que si l'on ne prend comme criterium du phénomène que la lyse de l'émulsion, le Bactériophage ne semble avoir aucune action sur de telles cultures.

Il est même inutile de s'adresser à des cultures aussi âgées : dans une culture de bacilles de SHIGA en bouillon, après seulement 24 h. d'étuve, j'ai vérifié que le tiers des germes environ ne sont déjà plus susceptibles de donner des colonies sur gélose. Si nous nous adressons au contraire à une culture sur gélose inclinée, presque tous les germes sont encore vivants après 24 h d'étuve à 37° Une culture en bouillon de 24 h. restera donc légèrement louche une fois la lyse terminée, tandis qu'une émulsion en bouillon d'une culture jeune sur gélose, renfermant le même nombre de bactéries, sera parfaitement limpide une fois la lyse achevée, tous les bacilles étant dans ce dernier cas vivants et susceptibles d'être attaqués par le Bactériophage. C'est pour cette raison qu'il est préférable d'effectuer les cultures du Bactériophage plutôt dans une émulsion que directement dans une culture en bouillon.

Certaines bactéries donnent une culture jeune homogène en bouillon, mais s'émulsionnent très mal quand elles sont cultivées sur gélose, le bacille pesteux par exemple. Quand on aura affaire à de telles bactéries, il sera préférable de faire agir le Bactériophage sur la culture en bouillon de la manière suivante Ensemencer légèrement un tube de bouillon avec la bactérie; quand la culture est bien louche, inoculer le Bactériophage actif vis-à-vis de cette bactérie et ajouter de suite un volume de bouillon neuf égal au volume de la culture : avant que les germes bactériophages aient eu le temps de se multiplier suffisamment pour parasiter un nombre appréciable de bactéries, la culture bactérienne a le temps de « repartir », ce qui fait que quand les germes bactériophages se trouvent assez nombreux, toutes les bactéries du milieu sont jeunes, partant facilement attaquables.

J'ai d'autre part vérifié que les produits qui se trouvent dissous dans la culture bactérienne âgée, produits qui, comme on le sait, entravent le développement des bactéries (le milieu est dit vacciné), n'ont aucune influence sur le phénomène de la lyse.

EXP. — Une culture du bacille de SHIGA en bouillon, de 15 jours, et une culture jeune de 18 h , sont centrifugées Le culot du premier tube est émulsionné dans le liquide du second, le culot du second dans le liquide du premier. Chacune des deux émulsions est ensuite inoculée avec une goutte de culture de Bactériophage. L'émulsion vieux bacilles-jeune milieu reste fort louche, l'émulsion jeunes bacilles-vieux milieu est parfaitement limpide après 7 h.

Il n'en est pas de même, comme nous le verrons, avec les pro-

duits de la lyse, qui, eux, sont des produits résultant de l'activité des ultramicrobes bactériophages, et comme tels entravent leur action.

INFLUENCE DU MILIEU

Il ressort de toutes les expériences précédentes que le véritable milieu de culture des ultramicrobes bactériophages c'est la bactérie vivante la nature du liquide dans lequel se trouve plongée la bactérie ne doit donc avoir aucune influence directe sur la culture du Bactériophage, pourvu que les bactéries y restent vivantes pendant un laps de temps suffisant et que ce liquide n'altère pas la constitution de la bactérie. C'est en effet ce que démontre l'expérience.

La seule condition que doit en outre remplir le milieu, c'est d'avoir une réaction alcaline : la lyse n'a pas lieu en milieu acide (1).

Exp — De l'eau peptonée (25 g de peptone Chassaing et 5 g. de chlorure de sodium par litre) est neutralisée à la phénolphtaléine, le milieu est donc franchement alcalin au tournesol Le liquide est réparti à raison de 10 cm³ par tube à essais J'ajoute au contenu de chaque tube une quantité d'acide chlorhydrique dilué de manière à former une gamme d'acidité croissante. Chaque tube est ensuite additionné d'une quantité d'une emulsion concentrée de bacilles de Shiga, suffisante pour obtenir une émulsion normale à 250 millions par cm³, chaque tube est enfin inoculé avec 1/1.000 de cm³ d'une culture du Bactériophage Après 24 h. d'étuve j'effectue la numération des ultramicrobes bactériophages suivant le procédé décrit

Tube	Réaction à la phenolphtaléine	Aspect de l'émulsion après 24 h.	Nombre d'ultramicrobes bactériophages par cm³	
1	0	louche très faible	400	millions
2	— 2	louche très faible	500	—
3	— 4	limpide	500	—
4	— 6	limpide	1 250	—
5	— 8	limpide	2 750	—
6	— 10	limpide	1.000	—
7	— 12	limpide	1 000	—
8	— 14	louche faible	250	—
9	— 16	trouble	0,5	—
10	— 18	trouble	1	—
11	— 20	trouble	0,5	—
12	— 22	trouble	0	—

(1) Certaines peptones commerciales contiennent de la glucose en quantité fort appréciable : l'emploi de ces peptones pourrait causer des mécomptes.

La neutralité au tournesol correspondant environ à — 16, on peut n conclure que le Bactériophage cesse de se multiplier dès que le ılieu présente la plus minime acidité au tournesol. Les ultramirobes qu'on décèle dans les tubes légèrement acides, où la lyse ne est pas produite, ne provenaient pas d'une multiplication, c'étaient mplement les ultramicrobes inoculés, restés vivants; ces ultramirobes sont d'ailleurs détruits dès que le milieu est franchement cide.

L'expérience suivante est encore plus démonstrative, elle vient de lus confirmer le fait que la bactérie constitue bien l'unique milieu e culture du Bactériophage (1).

EXP. — Je prépare 100 cm³ d'émulsion de bacilles de SHIGA jeunes dans de eau salée à 8,5 o/oo, neutre au tournesol, j'inocule cette émulsion avec gouttes d'une culture précédente de Bactériophage en eau salée et je répars ces 100 cm³ d'émulsion dans 5 tubes, à raison de 20 cm³ par tube. Le preier reste tel quel. le second est additionné d'une solution de soude caustiue de manière à obtenir une alcalinité correspondant à 10 mgr. de NaOH ır litre, le troisième est de même alcalinisé à 25 mgr de NaOH par litre; le ıatrième à 50 mgr., le cinquième à 100 mgr Après 18 h. à l'étuve le preier tube est aussi trouble qu'au début, le tube 2 est louche, les tubes 3, 4 5 presque limpide, ce louche à peine sensible étant dû au fait qu'un cerin nombre de bacilles meurent dans l'eau physiologique avant d'avoir été taqués

Quand la lyse est complète dans les trois derniers tubes, j'ajoute au tube 1, sté aussi trouble qu'au début, une quantité de soude correspondant à 10 mgr. par litre. 12 h plus tard la lyse s'est effectuée, l'émulsion est comırable comme limpidité à celle du tube 5. J'ai d'autre part vérifié que cette calinité n'avait par elle-même aucune influence sur le bacille de SHIGA qui développe normalement dans du bouillon alcalinisé à raison de 500 mgr. soude par litre

Tous les réensemencements restent stériles

Le Bactériophage est indéfiniment cultivable en série dans une ılution salée légèrement alcaline; le sel n'est même pas indispen-

(1) Comme nous le verrons dans un chapitre suivant, les bactéries, en génél, sont détruites après un séjour de très courte durée dans l'eau physiologique. D'autre part, les diverses souches du bacille dysentérique présentent une talité très variable : certaines, en bouillon, ne sont déjà plus repiquables rès cinq à six jours, d'autres le restent jusqu'à quarante-cinq à cinıante jours. Les expériences de lyse en eau physiologique doivent se faire ec ces dernières souches. Une émulsion en eau physiologique, d'une souche vitalité faible, est déjà stérile après 4 à 5 h.; c'est dire que l'immense ajorité des bactéries sont mortes avant que la lyse puisse s'effectuer. Le ctériophage n'a aucune action sur les bactéries mortes.

sable, j'ai opéré la culture en série dans une émulsion en eau chimiquement pure additionnée de 25 mgr. de soude par litre.

On pourrait avoir intérêt pour certaines recherches à employer un milieu synthétique permettant la culture du Shiga ; la culture et la lyse s'obtiennent parfaitement dans le milieu suivant : eau, 80 cm³, chlorure de sodium, 5 cm³, d'une solution à 10 o/o ; phosphate de potasse, 1 cm³ ; phosphate de soude, 1 cm³ ; asparagine, 3 cm³, toujours d'une solution à 10 o/o. Alcaliniser suivant la recherche à effectuer.

En bouillon une alcalinité relativement élevée ne gêne pas la lyse :

Exp — Cinq tubes contenant 10 cm³ de bouillon alcalinisé à — 8, sont additionnés d'émulsion de bacilles de Shiga et ensuite inoculés avec 1/50 de cm³ de culture de Bactériophage. J'ajoute ensuite au second tube 1/2 cm³ de solution décinormale de soude, 1 cm³ au troisième ; 1 cm³ 1/2 au quatrième ; 2 cm³ au dernier. Les quatre premiers tubes sont parfaitement lysés après 18 h , le dernier seul reste louche.

On peut donc poser en principe que, la question d'alcalinité mise à part, la composition du milieu, quant à ses qualités nutritives principalement, n'exerce aucune influence sur le développement du Bactériophage. Du moment qu'il a à sa disposition la bactérie vivante et normale vis-à-vis de laquelle il est actif, il se multiplie aux dépens de cette bactérie qui constitue son milieu de culture unique.

CULTURE DU BACTÉRIOPHAGE SUR MILIEUX SOLIDES. COLONIES ISOLÉES

Nous avons vu que le Bactériophage donnait des colonies apparentes sur gélose ; que, pour les obtenir, il suffisait d'inoculer très faiblement une émulsion de bacilles de Shiga en bouillon avec une culture du Bactériophage et d'étaler de suite sur gélose une goutte de cette émulsion. Après incubation on obtient une couche bacillaire présentant un certain nombre de plages dépourvues de toute culture apparente Si l'inoculation du Bactériophage a été massive, la surface de la gélose paraît stérile Examinons les caractères de ces cultures. .

La surface de la gélose restée nue par suite de la présence d'un grand nombre de germes bactériophages, garde indéfiniment cette

apparente stérilité : elle est devenue impropre à la culture du bacille de Shiga ; ensemencée à un moment quelconque avec une culture de ces bacilles, même d'une manière très abondante, on n'observe pas le plus léger développement. Le milieu est pourtant normal pour une autre bactérie : ensemençons-le, par exemple, avec du vibrion cholérique, la culture de ces bactéries s'y fera aussi bien que sur un milieu neuf. Si la culture du Shiga ne se fait pas, c'est que les germes bactériophages restent sur la surface de la gélose et exercent leur action dissolvante sur les bacilles qu'on y dépose. Le fait est facilement vérifiable ; prenons un tube de gélose resté en apparence stérile après avoir été recouverte avec une émulsion bactérienne inoculée avec une culture de bactériophage, lavons la surface de la gélose avec quelques gouttes de bouillon que nous introduisons ensuite dans une émulsion fraîche : cette émulsion sera lysée en l'espace de quelques heures.

Il arrive parfois, surtout quand on fait usage d'une gélose un peu sèche, qu'on obtient quelques colonies de Shiga, toujours situées à l'extrême bord de la couche de gélose, nous aurons à revenir sur cette particularité extrêmement intéressante dans la partie de ce travail relative aux cultures secondaires.

Au lieu d'une couche continue de germes bactériophages, déposons ces germes en des endroits limités, ce qui est facilement réalisé en déposant des gouttes de culture du Bactériophage en différents points sur la surface stérile d'un tube de gélose, ou encore en dessinant des traînées avec une boucle de platine trempée dans la culture du Bactériophage ; après avoir laissé ces tubes inclinés à l'étuve pendant quelques heures pour obtenir le dessèchement de la culture déposée et éviter le ruissellement, si nous arrosons la surface de la gélose avec une émulsion de bacilles de Shiga, nous verrons que les endroits imprégnés avec la culture du Bactériophage restent vierges de bacilles de Shiga qui, au contraire, se cultivent parfaitement sur les parties non touchées.

Quand, dans l'émulsion étalée sur gélose, le nombre de bacilles est infiniment grand et celui des ultramicrobes assez petit pour qu'il n'y en ait que quelques unités éparses à la surface de la gélose, on obtient une couche bacillaire parsemée de plages paraissant stériles. Ces plages ont une forme circulaire, le diamètre varie de 1 à 5 mm. Les plages sont en général d'autant plus étendues que l'émulsion bacillaire était plus faible, quoique suffisamment concentrée pour donner, non pas des colonies isolées mais une couche continue. Sur

ı même tube les plages sont d'autant plus étendues que la couche »us-jacente de gélose est plus épaisse, soit vers le fond du tube. Si on garde le tube présentant de telles plages à l'étuve à 37° pendant n certain nombre de jours, on s'aperçoit que les plages n'augmen-•nt pas d'étendue, leur diamètre reste indéfiniment à peu près ce u'il était au début. Aussitôt la culture bien développée, soit après 8-24 h d'étuve, touchons avec un fin fil de platine le centre d'une lage et trempons-le ensuite dans une émulsion de SHIGA · le Bacté-ophage se développe dans cette émulsion qui se lyse après quel-ues heures La plage stérile n'était donc pas ultrastérile, c'était onc bien en réalité une colonie de Bactériophage

Prélevons ensuite, toujours avec un fin fil de platine, une trace e la couche bacillaire à la périphérie d'une plage : l'ensemence-ıent sur gélose reste stérile et l'inoculation dans une émulsion ıontre que les germes bactériophages y sont présents.

Touchons maintenant, de la même manière, la couche bacillaire, on plus à la périphérie immédiate d'une plage, mais à une dis-ınce rapprochée, à 2 mm. par exemple ; les ensemencements mon-ent qu'à cet endroit les bacilles sont normaux, aucun ultramicrobe e s'y trouve.

Replaçons à l'étuve la culture présentant les plages et, trois ou uatre jours plus tard, répétons le dernier essai : touchons la cou-he bacillaire à 2 mm. d'une plage et ensemençons sur gélose et en mulsion : le Bactériophage y est maintenant présent. Les ultrami-robes bactériophages ont donc envahi peu à peu la couche bacil-ıire, toutefois cet envahissement est lent, de plus en plus lent avec ; temps ; l'anneau envahi, même après plusieurs mois, n'est pas upérieur à quelques millimètres. En dehors de cette zone le SHIGA este repiquable aussi longtemps qu'un tube témoin sans Bactério-›hage

Pourquoi le Bactériophage n'envahit-il pas toute la couche bacté-ienne ? Il y a à cela deux raisons.

Les germes bactériophages attaquent d'autant plus facilement une ›actérie que cette bactérie est plus jeune. Les ultramicrobes dépo-és sur la gélose se trouvent dès l'ensemencement au voisinage de ›acilles qui se reproduisent activement aussitôt leur dépôt sur le nilieu nutritif, ils trouvent donc à leur portée des bacilles très jeu-ıes disposés en couche très mince sur la gélose · la lyse peut être omplète, d'où l'apparente stérilité de la plage. Mais en dehors de la one envahie par les ultramicrobes dès les premières heures, les

bacilles se développent librement, forment une couche de plus en plus épaisse de bacilles de plus en plus âgés, ce qui revient à dire de plus en plus résistant à la lyse. Le fait est facilement vérifiable par expérience directe. Ensemençons largement la surface d'une boîte de PETRI avec une culture de SHIGA, déposons de suite en un point une goutte de culture du Bactériophage, plaçons à l'étuve; 3 h. plus tard, déposons une seconde goutte en un autre point, puis une trosième après 6 h , une quatrième après 12 h et une dernière après 20 h Une quinzaine d'heures plus tard, aux endroits où ont été déposées les trois premières gouttes, la gélose est libre de culture ; à la place de la goutte déposée après 12 h. on a une légère couche composée de bacilles morts ; à la place de celle déposée à la 20^e h. la couche paraît à peu près normale Ce n'est d'ailleurs qu'une apparence car les réensemencements pratiqués en prélevant la semence en ce point restent stériles : les bacilles sont tués mais non lysés. Ces cinq taches reproduisent donc en détail les divers aspects de la colonie isolée de Bactériophage, du centre à la périphérie.

La seconde raison est d'un caractère plus général : il s'agit d'un phénomène commun à la généralité des microbes cultivables. Les colonies de Bactériophages se comportent absolument comme des colonies bactériennes quelconques, qui, à l'exception de celles du *Proteus*, n'envahissent jamais la surface des milieux solides. Ensemençons sur gélose une émulsion de SHIGA assez faible pour n'obtenir que quelques colonies isolées : après 18-24 h. chaque colonie aura de 2 à 4 mm. de diamètre, les plus grandes se trouvant à l'endroit où la gélose offre une couche plus épaisse, soit vers le fond du tube. La colonie s'accroîtra ensuite très lentement, de plus en plus lentement avec le temps, et après deux mois l'anneau d'accroissement ne sera pas supérieur à quelques millimètres. Il s'est pourtant trouvé des bactériologues à qui il a paru singulier que le Bactériophage n'envahisse pas toute la surface couverte de bactéries, sans penser que, loin d'être en cela dissemblable des autres microbes cultivables, la colonie isolée de Bactériophage se comportait rigoureusement comme une colonie microbienne quelconque. Pourquoi une colonie bactérienne ne continue-t-elle pas à croître jusqu'à envahir toute la surface de la gélose? Parce que les substances solubles résultant de l'activité vitale de la bactérie diffusent dans la gélose et que ces substances constituent de véritables antiseptiques spécifiques qui entravent la culture, le milieu se trouve « vacciné » autour de la colonie; plus la gélose est profonde, plus les

colonies sont espacées les unes des autres, plus grand est le volume de substratum où peut se diluer la substance antiseptique, plus grandes sont les colonies Il en est exactement de même avec les colonies de Bactériophage : plus les colonies sont espacées, plus le substratum a d'épaisseur, plus le diamètre des colonies est grand. Des expériences directes permettent d'ailleurs de montrer que cette interprétation est exacte et que les substances solubles provenant de la lyse, substances résultant de l'activité vitale du Bactériophage, entravent son action, ralentissent sa culture et empêchent la lyse totale.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU MILIEU EN BACTÉRIES ACTION INHIBITIVE DES PRODUITS DE LA LYSE

Dans toutes les expériences concernant l'action du Bactériophage en milieu liquide, nous n'avons jusqu'ici envisagé que le cas d'émulsions renfermant environ 250 millions de bactéries par centimètre cube

Qu'arrivera-t-il si nous faisons varier le titre de l'émulsion entre 50 et 500 millions? Le résultat final sera toujours le même, lyse totale, et même le temps au bout duquel la lyse est complète ne varie pas dans des limites fort étendues pour une même quantité d'ultramicrobes bactériophages inoculés, vu la rapidité de développement de ces germes. Examinons les deux cas extrêmes.

EXP. — 1° L'inoculation en bactériophages a été massive, soit 1/50 de cm³; c'est dans ce cas où la différence de temps est le plus marqué.

Nombre de bacilles par cm³	Lyse terminée en
50 millions	4 h 1/2
100 —	4 h. 1/2
200 —	5 h.
250 —	5 h.
300 —	5 h 1/2
400 —	6 h.
500 —	8 h.

2° L'inoculation en bactériophages a été très faible, soit, dans l'expérience suivante, un millionième de centimètre cube.

Nombre de bacilles par cm³	Lyse terminée en
—	—
50 millions	14 h. 1/2
100 —	14 h 1/2
200 —	14 h 1/2
250 —	14 h 1/2
300 —	16 h
400 —	16 h
500 —	18 h

Ces résultats sont fort compréhensibles : dans le premier cas le nombre des ultramicrobes étant très grand dès le début, toutes les bactéries, ou la plus grande partie, sont de suite attaquées, ce qui arrête net le développement de la culture bactérienne. Dans le second cas, vu le petit nombre d'ultramicrobes inoculés, très peu de bactéries sont attaquées au début et celles qui restent indemnes peuvent se développer librement, et cela d'autant mieux que l'émulsion est plus faible. Il suffit pour s'en convaincre de vérifier comparativement de temps en temps l'opacité des diverses émulsions . toutes se troublent de plus en plus durant les premières heures et se trouvent présenter une opacité à peu près comparable 5 à 6 h après l'inoculation, correspondant environ à 650 millions de bacilles par centimètre cube. En un mot, quel que soit le titre primitif de l'émulsion, du moment qu'elle n'est inoculée qu'avec un nombre restreint d'ultramicrobes bactériophages, cela revient toujours à opérer sur une émulsion à 650 millions par centimètre cube, puisque dans tous les cas les bacilles se reproduisent jusqu'à atteindre ce nombre , la lyse se fait par conséquent toujours à peu près dans le même temps.

Une émulsion de bacilles jeunes, renfermant jusqu'à 500 millions de bactéries par centimètre cube est totalement lysée sous l'action d'un Bactériophage *au maximum d'activité* ; au-dessus de cette concentration le milieu ne s'éclaircit pas complètement, il reste d'autant plus louche que l'émulsion était plus concentrée, et cela quelle qu'ait été la quantité d'ultramicrobes bactériophages inoculés : avec une émulsion à un milliard de bacilles par centimètre cube, par exemple, la lyse ne sera jamais totale, qu'elle ait été inoculée avec quelques unités ou avec quelques milliards d'ultramicrobes. Pourtant, même s'il s'agit d'émulsions extrêmement chargées, les réensemencements pratiqués en bouillon ou sur gélose 18-24 h. après l'inoculation restent stériles, les bacilles sont tués mais non pas lysés en totalité.

Exp Emulsion à (millions de bacilles par cm³)	inoculée avec culture Bactériophage	Aspect de l'émulsion après 24 h
—	—	—
5 000	0,1 cm³	trouble
2 000	0,1 cm³	louche
1 000	0,1 cm³	léger louche
500	0,1 cm³	limpide

Après huit jours l'aspect est le même

Ce sont les produits solubles, résultant de l'activité des ultramicrobes bactériophages qui exercent une action inhibitive sur la lyse, il s'agit d'ailleurs d'un phénomène d'ordre général commun à tous les microorganismes cultivables.

Exp. — Une émulsion en bouillon à 250 millions de bacilles par cm³ est inoculée avec 1/1.000 de cm³ d'une culture de Bactériophage Le lendemain matin, soit après 14 h, la lyse est parfaite. Une numération des ultramicrobes donne 1 600 millions par cm³.

A ce moment j'ajoute à l'émulsion lysée une quantité d'émulsion concentrée de manière à reporter le titre à 250 millions par cm³ 7 h. plus tard le milieu est de nouveau limpide Numération des ultramicrobes : 2.100 millions.

Cette deuxième lyse effectuée, j'ajoute encore une quantité égale d'émulsion concentrée cette fois la lyse ne s'achève que 48 h. plus tard et le bouillon n'est pas franchement limpide. Numération des ultramicrobes : 2.400 millions par cm³.

Le milieu contient donc à ce moment la substance dissoute de 750 millions de bacilles par cm³ J'ajoute une quatrième fois une quantité d'émulsion concentrée telle que le nombre de bacilles soit de 250 millions par cm³. Huit jours plus tard le liquide s'est éclairci mais reste encore nettement louche. Numération des germes Bactériophages : 2 600 millions par cm³

Les réensemencements sur gélose et en bouillon restent stériles.

On voit nettement que plus le milieu est riche en substances dissoutes, plus l'inhibition est marquée et moins la culture du Bactériophage est active

La quantité de germes bactériophages introduits comme semence dans l'émulsion n'a d'ailleurs aucune influence sur le résultat final.

Exp. — Je prépare les tubes suivants d'émulsion de bacilles de Shiga :

Tubes 1 et 5 à 250 millions par cm³
— 2 et 6 à 500 —
— 3 et 7 à 1.000 —
— 4 et 8 à 2.000 —

Les tubes 1, 2, 3, 4 sont inoculés avec 1/1 000 de cm³ d'une culture de Bactériophage,

Les tubes 5, 6, 7, 8 sont inoculés avec 1/2 cm^3 de la même culture de Bac-
'iophage, soit 500 fois plus
Après 8 h. les tubes 1 et 5 sont limpides
Après 14 h. les tubes 1, 2, 5 et 6 sont limpides
Après 4 jours, les tubes 1, 2, 5 et 6 sont toujours limpides, le tube 3, très
;gèrement louche, 4 et 7 louches, 8 trouble

La lyse ne paraît donc pas influencée par le nombre d'ultramicro-
's inoculés Nous verrons dans un chapitre suivant qui traitera de
résistance des bactéries à l'action du Bactériophage, que, contrai-
ment à ce qu'on serait tenté d'admettre *a priori*, la lyse est même
autant plus parfaite que la quantité de culture du Bactériophage
outée à l'émulsion a été faible.

L'émulsion peut encore varier en « qualité » ; on peut opérer soit
r des bacilles d'âges différents, soit sur des bacilles de souches
fférentes. En ce qui touche la différence de souches, l'allure du
iénomène reste à peu de chose près la même, en ce qui concerne
ut au moins le Bacille de SHIGA ; nous verrons qu'il n'en est pas
: même avec d'autres bactéries, le Bacille typhique, par exemple.

Quant à la question de l'âge des bacilles soumis à l'action du Bac-
riophage, nous avons déjà vu que plus un bacille est jeune, plus
cilement il est attaqué et que cette différence est bien due à l'état
ı bacille lui-même et non aux substances solubles résultant de
'n activité, substances qui « vaccinent » le milieu, suivant l'expres-
on consacrée. La bactérie vaccine le milieu pour elle-même par
s produits qui résultent de son activité ; le Bactériophage agit de
ême de son côté : les produits solubles résultant de leur activité
spective n'ont rien de commun.

INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSIQUES EXTÉRIEURES

La présence ou l'absence d'oxygène n'exerce pas d'influence sur
marche du phénomène : la rapidité de multiplication des ultra-
icrobes et la durée de la lyse sont les mêmes en aérobiose ou en
ıaérobiose.

Par contre, comme il fallait s'y attendre, l'influence de la tempé-
ıture est marquée.

EXP. — Trois tubes d'émulsion de bacilles de SHIGA sont inoculés, chacun
rec un dix millionième de cm^3 d'une culture de Bactériophage Ces tubes
nt placés, le premier vers 8°, le second à 22°, le troisième à 37°.

Emulsion à 8° Aucune lyse après 24 h.; lyse complète après 15-16 jours. Le nombre de germes bactériophages est à ce moment de 180 millions par cm^3, le nombre de germes inoculés était de 20 à 25 par cm^3

Emulsion à 22° : la multiplication commence après 3 h., passant de 20 à 75 germes par cm^3; après 5 h 8.000; après 8 h, 190 000. Lyse complète après 25 h. 780 millions d'ultramicrobes par cm^3

Emulsion à 37° : numération des germes bactériophages après 2 h., 210 par cm^3; 3 h 1/2, 10 000, 5 h., 200 000, 13 h, lyse parfaite : 1 700 millions par cm^3.

Entre 37° et 41° l'allure du phénomène ne présente pas de variations appréciables Entre 41° et 44° la lyse est de moins en moins complète, et cela pour deux raisons : le développement des ultramicrobes est de moins en moins actif et le nombre de bacilles tués par suite de l'élévation de la température est de plus en plus élevé, les bacilles susceptibles d'être attaqués et par conséquent dissous, sont donc de moins en moins nombreux. Pourtant les passages en série du Bactériophage à 44° sont encore possibles. L'ultramicrobe se cultive à plus haute température que le Bacille dysentérique dont le développement cesse vers 43°.

Somme toute la température eugénésique pour le Bactériophage est la même que pour la bactérie, ce qui est logique, puisque toutes les expériences nous ont montré que plus une bactérie est normale mieux elle est attaquée.

ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR LA LYSE

Pour terminer l'étude macroscopique du phénomène, il nous faut considérer l'action sur la lyse de diverses substances qu'on peut ajouter à l'émulsion.

Comme nous le verrons à propos des propriétés du Bactériophage, sans présenter une résistance aussi marquée que certains ultramicrobes aux agents de destruction physique ou chimique, l'ultramicrobe bactériophage est cependant moins fragile que la majorité des microbes cultivables.

Au point de vue particulier de la lyse, nous devons nous rappeler que l'action des antiseptiques est complexe : le Bactériophage ne pouvant se cultiver qu'aux dépens de bactéries vivantes, toute action s'exerçant sur les bactéries de l'émulsion retentit sur le phéno-

ıène, même si cette action est faible ou nulle sur les germes Bac-:riophages. La résistance spéciale du Bactériophage aux antisepti-ıes n'exerce donc aucune influence sur le phénomène de la lyse.

Les substances antiseptiques introduites dans l'émulsion à doses ıffisamment faibles pour que leur action sur la bactérie soit indif-ìrente, ne modifient pas l'allure du phénomène ; si au contraire la uantité de ces substances est telle que l'action antiseptique puisse : faire sentir, les ultramicrobes bactériophages ne pouvant se mul-plier faute de bactéries normales, la lyse ne s'effectue pas Dans c dernier cas on comprend que les conditions de l'expérience sont :s mêmes que si on mettait le Bactériophage en présence de bac-ìries préalablement touchées par l'antiseptique en question, nous vons déjà vu que ni la culture des germes bactériophages, ni la /se qui en est la conséquence, ne pouvaient se produire dans ces onditions.

Je rappellerai les expériences soumises précédemment, qui mon-rent que le Bactériophage ne se multiplie pas dans les émulsions e SHIGA en bouillon fluoruré à 1 o/o, dans lequel les bactéries estent pourtant vivantes pendant un temps qui suffirait amplement our que la lyse puisse s'effectuer d'une manière totale s'il s'agis-ait de bactéries normales. La glycérine agit d'une manière dif-ìrente : à fortes doses cette substance empêche la culture des actéries, mais il doit s'agir d'une action plutôt empêchante que éellement antiseptique.

Exp — Les bouillons glycérinés suivants sont ensemencés avec une goutte 'une culture en bouillon de 18 h. de bacilles de SHIGA

Bouillon	+ 5 o/o	glycérine	Culture très abondante.
—	+ 10 o/o	—	Culture faible
—	+ 15 o/o	—	Culture très faible avec culot.
—	+ 20 o/o	—	Milieu limpide avec un culot de bacilles assez abondant.
—	+ 25 o/o	—	Milieu limpide, culot faible.
—	+ 30 o/o	—	Milieu limpide, culot faible
—	+ 35 o/o	—	Milieu limpide, culot à peine perceptible
—	+ 40 o/o	—	Aucune culture

Tous les réensemencements effectués au bout de 48 h en bouillon ordi-ıaire donnent des cultures normales.

Le bacille typhique est plus sensible à l'action de la glycérine avec 10 o/o, a culture est déjà insignifiante.

Les bactéries émulsionnées dans du bouillon glycériné, même à

35 o/o, restent donc vivantes au moins pendant 48 h., c'est-à-dire pendant un temps largement suffisant pour que le Bactériophage puisse se cultiver et produire la lyse, comme c'était d'ailleurs le cas pour les bouillons fluorurés : or les expériences suivantes montrent qu'en effet la culture du Bactériophage est absolument normale en milieu glycériné tandis qu'elle était nulle en milieu fluoruré. J'insiste sur la culture de l'ultramicrobe bactériophage et la lyse qui est la conséquence de cette culture, en milieu glycériné, car j'aurai à revenir sur ces expériences quand nous aurons à grouper les preuves touchant la nature vivante du Bactériophage

Exp. — *Tube 1* — Emulsion de Shiga à 250 millions par cm³ dans du bouillon glycériné à 35 o/o, inoculation avec 1/50 de cm³ d'une culture de Bactériophage. Lyse normale en 8 h Emulsion témoin en milieu glycériné, sans Bactériophage, repiquable jusqu'au septième jour

Tube 2 — Emulsion de Shiga à 250 millions par cm³ dans du bouillon glycériné à 50 o/o, inoculation avec 1/50 de cm³ de culture de Bactériophage. Lyse normale en 10 h. Emulsion témoin, sans Bactériophage, repiquable jusqu'à la 48e h

Tube 3. — Emulsion de Shiga à 250 millions par cm³, dans du bouillon glycériné à 60 o/o, inoculée avec :

a. 1/2 cm³ de culture de Bactériophage lyse parfaite en 8 h.

b. 1/50 de cm³ lyse parfaite en 9 h

c. 1/10 000 de cm³ . pas de lyse Les ultramicrobes, trop peu nombreux, n'ont pas eu le temps de se développer : les bacilles étaient morts auparavant.

Emulsion témoin, sans Bactériophage, repiquable seulement jusqu'à la 18e h.

En milieu glycériné les bactéries restent normalement attaquables par le Bactériophage tant qu'elles sont vivantes.

De ce que les bactéries meurent assez rapidement en milieu glycériné il ne faudrait d'ailleurs pas conclure que la glycérine agit comme un antiseptique véritable, c'est-à-dire en modifiant le protoplasma de la bactérie : personne n'a jamais songé à dire que le chlorure de sodium à faible dose fut un antiseptique, et pourtant la survie des bactéries non sporulées émulsionnées dans de l'eau physiologique est extrêmement courte, 24 à 48 h. pour le bacille de Shiga.

Les expériences de lyse en milieu glycériné sont d'autant plus intéressantes que la glycérine, à plus forte concentration, stérilise les cultures du Bactériophage.

L'addition, à l'émulsion, de substances restant sans action sur les

bactéries n'a en général aucune influence sur le phénomène de la lyse ; tel est le cas, par exemple, pour le sérum normal, le liquide d'ascite, l'urine, le chlorure de sodium à la dose de 25 g par litre. Le chlorure de calcium, par contre, a une action empêchante très nette, le chlorate de potasse retarde la lyse. A faible dose, le sulfate de magnésie et les phosphates de potasse et de soude favorisent la lyse, surtout dans le cas de souches du Bactériophage d'activité faible.

L'addition à l'émulsion de sucres non fermentescibles par la bactérie vis-à-vis de laquelle s'exerce l'action du Bactériophage, n'a aucune influence sur le phénomène de la lyse Dans le cas de sucres fermentescibles si l'inoculation en bactériophages a été massive, la lyse est normale ; si l'inoculation a été faible, la lyse ne se produit pas ou reste incomplète suivant la dose inoculée. La raison en est simple : nous avons vu que le Bactériophage est très sensible à l'acidité ; avec une inoculation minime la bactérie commence à se développer, attaque les sucres et le milieu s'acidifie avant que le nombre des ultramicrobes soit suffisant pour que la lyse ait eu le temps de se produire.

SUBSTANCES BACTÉRIENNES SOLUBILISÉES

Les bactéries sont lysées en totalité par le Bactériophage, sans résidus ; cette lyse ne peut être, en dernière analyse, que le résultat d'une action diastasique. Aucune action microbienne n'est exercée par la seule présence du germe, ce sont toujours les produits de sécrétion qui agissent. Les ultramicrobes sécrètent nécessairement une ou des diastases lytiques, des lysines, qui liquéfient les substances qui constituent le corps microbien. Nous reviendrons sur ce point. J'ai peu étudié cette partie du phénomène au point de vue chimique, qui est du ressort des spécialistes. Tout ce qu'il m'est possible de dire c'est que ce qui reste en solution une fois la lyse terminée, le milieu étant limpide, n'est pas constitué par des albumoses, comme l'indique l'action de la température.

La viscosité d'une émulsion à 500 millions de bacilles de Shiga par cm^3 est différente de celle du bouillon qui a servi à préparer l'émulsion : un volume de ce bouillon donnant 100 gouttes normales, en donne 97 pour l'émulsion lysée.

La dégradation des substances provenant des corps bactériens se poursuit certainement pendant un certain temps après la lyse, ce qui le montre, c'est qu'un bactériolysat de SHIGA, inoculé à un lapin aussitôt la lyse terminée, le tue à une dose à peu près comparable à celle d'une émulsion bacillaire de même titre; la toxicité du bactériolysat baisse très rapidement et une huitaine de jours plus tard elle a déjà fortement diminué; après 15 jours elle est à peu près nulle. On sait d'autre part que l'endotoxine du Bacille de SHIGA est très stable.

Nous verrons dans un des chapitres suivants que la précipitation par l'alcool permet d'obtenir les lysines sécrétées par les ultramicrobes bactériophages.

L'ULTRAMICROBE BACTÉRIOPHAGE · PARASITE INTERNE

Nous n'avons jusqu'ici envisagé le mode d'action du Bactériophage qu'au point de vue macroscopique, diverses expériences vont nous permettre de pénétrer plus avant dans l'intimité du phénomène.

Une première question se pose : l'expérience nous a montré que le Bactériophage ne peut se développer qu'aux dépens de bactéries vivantes qui constituent son unique milieu de culture, et que cette culture se faisait vraisemblablement dans l'intérieur même des bactéries. L'examen à l'ultramicroscope nous montrera qu'il en est bien ainsi, mais auparavant passons en revue quelques expériences qui nous permettront de voir de quelle manière se produit l'infection des bactéries

J'ai d'abord essayé d'effectuer la culture du Bactériophage anti-Shiga dans un filtrat obtenu en passant à la bougie des cultures en bouillon de bacilles dysentériques âgées de 1, 7, 14 et 21 jours, sans aucun résultat. Deux numérations des ultramicrobes effectuées, l'une de suite après l'inoculation, l'autre après huit jours d'étuve à 37°, m'ont donné exactement le même nombre de ces germes. Le Bactériophage ne peut donc se multiplier dans un milieu renfermant les produits d'excrétion des bacilles, il lui faut les corps des bacilles eux-mêmes.

Si le Bactériophage se multiplie réellement à l'intérieur des corps bactériens, les ultramicrobes inoculés dans une émulsion, doivent,

vant toute multiplication, disparaître du liquide. En effet, chaque ltramicrobe doit tout d'abord pénétrer dans une bactérie, c'est là u'il doit se multiplier, et une fois la bàctérie dissoute les ultrami-robes reparaîtront dans le liquide. La vérification est aisée

Exp — Je prépare les émulsions suivantes

1° 100 cm^3 d'émulsion de bacilles de Shiga à 250 millions par cm^3 sont aoculés avec 1/4 de cm^3 d'une culture de Bactériophage.

2° 100 cm^3 d'émulsion de vibrions cholériques à 250 millions par cm^3 ont également inoculés avec 1/4 de cm^3 de la même culture de bactériophage nti-Shiga

3° 100 cm^3 de bouillon neuf sont additionnés de 1/4 de cm^3, toujours de la ıême culture de Bactériophage.

Les émulsions sont placées à l'étuve à 37°

De suite après l'inoculation du Bactériophage, après 30 minutes, puis enfin près une heure, je prélève 20 cm^3 de chacun des trois liquides et je les cen-rifuge pendant dix minutes à 4 000 tours par minute.

J'ai donc neuf tubes centrifugés Je prélève 1/50 de cm^3 de chacun des iquides surnageants que j'introduis dans autant de tubes contenant 10 cm^3 'une émulsion de Shiga, et j'effectue une numération des ultramicrobes en talant 1/50 de cm^3 de chacune de ces neuf émulsions sur six boîtes de Petri, e manière à obtenir une moyenne Le résultat de ces numérations me don-era donc le nombre d'ultramicrobes restés dans le liquide, ceux qui auront énétré au moment de la centrifugation dans des bactéries se trouvant néces-airement dans le culot. Voici les résultats.

Tube 1. Emulsion Shiga + bactériophages.

a) Prélèvement immédiat : 214, 193, 187, 221, 229, 183 plages

Moyenne : 204 Soit 5 millions de germes bactériophages par cm^3 d'émul-ion primitive de suite après l'inoculation.

b) Prélèvement après 30 minutes 3, 7, 4, 6, 6, 3 plages

Moyenne 5 Soit 125.000 germes bactériophages dans l'émulsion primitive o minutes après l'inoculation, c'est-à-dire que sur 41 ultramicrobes inoculés, o ont disparu du liquide.

Une numération directe de l'émulsion sans centrifugation, donne 5 millions 'ultramicrobes par cm^3 il est donc certain que les ultramicrobes qui ont dis-ıaru du liquide ont été centrifugés avec les bacilles. Or, comme nous allons a voir par les deux expériences témoins, en l absence de bacilles de Shiga, ette sédimentation ne se produit pas (tout au moins pour une vitesse de .000 tours).

c) Après 1 heure une nouvelle numération, pratiquée comme précédemment ur le liquide centrifugé, donne une moyenne de 8 plages, soit 200.000 ultra-aicrobes par cm^3 sensiblement le même nombre qu'après 30 minutes

Numération sur l'émulsion non centrifugée, 6 millions 1/2 d'ultramicrobes, 'est-à-dire, à peu de chose près, le même nombre qu'immédiatement après 'inoculation.

Notons que dans l'hypothèse envisagée de la culture intrabactérienne, cha-

que colonie en formation dans l'intérieur d'une bactérie ne peut donner qu'une seule plage; de même que dans la numération des bactéries par les procédés connus, tout groupe de bactéries ensemencé sur gélose ne donne qu'une colonie.

d) Une nouvelle numération effectuée sur l'émulsion centrifugée et non centrifugée après 1 h. 30 donne le même nombre d'ultramicrobes, soit, 90 millions : les germes inoculés ont donc passé de 5 à 90 millions, ils se sont donc accrus dans la proportion de 1 à 18, et cela apparemment d'une manière brusque, ce qui ne peut se faire que par suite d'une mise en liberté de véritables colonies de 18 germes en moyenne. Nous verrons que l'examen à l'ultramicroscope montre en effet que la lyse de la bactérie parasitée se produit brusquement par éclatement.

Tube 2, témoin. Emulsion Vibrion + Bactériophage.

Numération effectuée de suite après addition du Bactériophage : sur l'émulsion centrifugée, 201 plages, non centrifugée, 211.

Après 30 minutes émulsion centrifugée 210 ; non centrifugée 216.

Après 1 heure : émulsion centrifugée, 203, non centrifugée 199.

Après 1 h 30' émulsion non centrifugée 207.

Tube 3, témoin. Bouillon stérile + Bactériophage.

De suite 206 et 210 ultramicrobes par cm³.

Après 30 minutes 201 et 211.

Après 1 h 203 et 206

Après 1 h. 30' 198

Comme on le voit, rien ne se passe en l'absence de bactéries attaquables : les ultramicrobes inoculés restent inertes dans le liquide.

La multiplication en présence de bacilles de Shiga ne laisse place à aucun doute touchant les points suivants :

après 30 minutes de contact à 37° les ultramicrobes ont presque totalement disparu du liquide, ils sont fixés par les bacilles. Après 1 heure, la situation est la même;

après 1 h 30, accroissement brusque du nombre des ultramicrobes;

la fixation est élective : elle n'a pas lieu en présence du Vibrion cholérique, pris comme test, sur lequel le Bactériophage employé n'avait aucune action.

On peut en conclure que la culture des ultramicrobes se fait à l'intérieur des corps bacillaires, d'autant plus que tous les autres faits viennent corroborer cette conception imposée par l'expérience. Nous comprenons maintenant la culture du Bactériophage par à-coups successifs que nous avons constatés lors de l'étude de la multiplication des germes : chacun des ultramicrobes inoculé pénètre à l'intérieur d'un bacille, s'y multiplie ; à un moment donné le

orps bacillaire éclate, mettant ainsi en liberté la colonie d'ultramicrobes qui s'est formée au sein de son protoplasma. Nous verrons une confirmation de ce fait lors de l'examen du phénomène à l'ultramicroscope et de l'étude de l'action temporairement inhibitive du sérum antibactériophage.

Nous avons vu que les accroissements successifs sont séparés par un intervalle d'environ une heure et quart à une heure et demie; d'autre part une expérience complémentaire, exécutée de la même manière, mais en centrifugeant l'émulsion de 10 en 10 minutes au cours de la première demi-heure, m'a montré que très peu d'ultramicrobes sont fixés après 10 minutes, ils le sont presque tous après 20 minutes. L'accolement demande donc environ un quart d'heure.

Étant donné la rapidité de multiplication des ultramicrobes et le temps écoulé entre chaque accroissement successif, on peut facilement calculer qu'un ultramicrobe donne, dans chaque bactérie, naissance à une colonie variant entre 15 et 25 individus, et cela en l'espace d'une heure à une heure et quart.

LA BACTÉRIOLYSE AU MICROSCOPE

Prenons toujours comme exemple l'action du Bactériophage anti-SHIGA sur une émulsion de bacilles dysentériques.

Nous avons vu que si l'inoculation du Bactériophage a été massive tous les bacilles sont attaqués dès le début, leur multiplication s'arrête net : après 2 ou 3 h. le milieu commence à s'éclaircir peu à peu et devient complètement limpide quelque temps après. Si au contraire l'inoculation a été minime, les quelques ultramicrobes inoculés ne contaminent qu'un nombre égal de bacilles, l'immense majorité de ceux-ci reste indemne et ils se cultivent comme ils le feraient dans un milieu neuf; mais les ultramicrobes se multipliant également, et cela suivant une progression plus rapide que celle des bacilles, en peu d'heures leur nombre devient égal ou supérieur à celui de ces derniers : c'est à ce moment que, macroscopiquement, la lyse commence.

1° Examinons d'abord le premier cas, celui d'une inoculation massive. Prélevons de temps en temps une goutte de l'émulsion jusqu'au

oment où la lyse est complète, étalons la goutte sur une lame et lorons, soit par la méthode de Gram, soit à la thionine phéniiée, soit par la méthode de Romanowsky-Giemsa : toutes donnent ailleurs à peu près le même aspect.

Voici les résultats d'un de ces examens.

Emulsion de Shiga à 250 millions par cm^3 inoculée avec 1/10 de cm^3 d'une lture de Bactériophage et placée à l'étuve à 37°

Après 15 minutes . aspect d'une culture normale de Shiga.

Après 30 minutes même aspect ; quelques bacilles prennent mal la couleur

Après 45 minutes · le nombre des bacilles mal colorés est environ de 10 o/o.

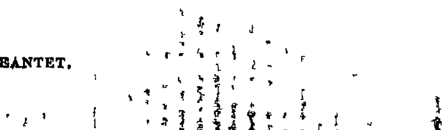
Entre 1 h et 2 h . le nombre des bacilles mal colorés augmente sans cesse après 2 h. on n'en trouve que de rares échantillons prenant normalement coloration On ne voit d'autre part que des débris informes et des granuions provenant certainement des bacilles déjà lysés, car on en observe de nblables, très nombreuses, dans les vieilles cultures normales de Shiga ; granulations se dissolvent plus lentement que le reste des autres subinces constituant le corps bactérien. On distingue enfin, et ceci est le point plus important, des formes sphériques ou plus ou moins ellipsoïdales, de nensions assez variables, toujours rares, ayant de 4 à 7 μ par 3 à 5 ; nous rrons dans un moment de quoi il s'agit Enfin quelques rares formes bacilres bien colorées, ayant de 8 à 12 μ de longueur

Entre 2 et 3 h., les débris informes augmentent considérablement, les fores bacillaires diminuent rapidement On voit encore quelques rares formes hériques.

Après 4 h. la lyse devient de plus en plus complète. On ne voit plus qu'un cille mal coloré tous les deux ou trois champs Peu à peu les débris informes disparaissent à leur tour ainsi que les granulations Après 36 h on ne ut plus rien distinguer sur préparations colorées

A l'ultramicroscope on ne voit à aucun moment d'autres éléents figurés que les bacilles (dont le nombre diminue peu à peu à irtir de la 2e h. environ), et, sans qu'on puisse dire qu'il s'agit d'un ément figuré, des granules extrêmement fins. Au début l'aspect s bacilles est normal ; après 45 à 60 minutes on voit de fins granles, de plus en plus nombreux, dans l'intérieur des bacilles, le ombre de bacilles avec granules inclus augmente rapidement avec minution parallèle du nombre des bacilles normaux. Voici la par la plus intéressante de l'observation (1) : de 1 h. 15 à 1 h. 30 rès le début, on commence à voir des bacilles ventrus et des corps hériques, contenant un nombre variable de granules, de 15 à 20 moyenne, ayant, si on les compare à un bacille normal, de 3 à

(1) Observé pour la première fois par P Jeantet.



μ de diamètre. Si l'on suit avec attention un de ces corps sphéri-
ues, on assiste après un temps variable, pouvant aller jusqu'à une izaine de minutes, à un véritable éclatement s'effectuant en l'espace 'une fraction de seconde. Aussitôt après, il reste à la place du corps phérique un léger flocon nuageux qui se dissout peu à peu, libérant insi les fins granules. Ces corps sphériques sont surtout abondants u moment où la lyse est la plus active. Il ne peut y avoir aucun oute au sujet de leur nature : ce sont des bacilles qui, sous l'effet 'une force qui ne peut être qu'interne, prennent d'abord une forme lobuleuse puis éclatent ; ce qui le prouve, c'est qu'on assiste par-
ois à l'éclatement de bacilles renflés avant même d'avoir pris la orme sphérique. Cette observation est la preuve directe que c'est ien à l'intérieur même des bacilles que l'ultramicrobe se multiplie t exerce son action : la destruction s'opérerait d'une toute autre manière s'il s'agissait d'une action dissolvante extérieure, de plus la orme sphérique et l'éclatement prouvent sans contestation possible ue la force qui agit est interne.

Que représentent les fins granules qui ne sont décelables qu'à ultramicroscope ? On ne peut rien affirmer, il est toutefois permis e supposer qu'il s'agit des ultramicrobes et cela en se basant sur examen comparatif de cultures dont le nombre d'ultramicrobes a té préalablement compté par numération sur gélose : en prenant eux cultures présentant de grandes différences, on remarque tou-
ours un parallélisme entre le résultat de la numération et le nom-
re de granules observés. Je rappellerai également que nous avons u précédemment à propos de la multiplication des germes, que cette multiplication semble se faire par à-coups successifs (ce qui corres-
ond à l'éclatement d'un grand nombre de bacilles parasités), et que nombre d'ultramicrobes mis en liberté après 1 h. 1/4 à 1 h. 1/2 orrespond environ à 18 germes nouveaux pour un inoculé ; or nous enons de voir que le nombre de granules lors de l'éclatement varie e 15 à 25. Il y a donc de grandes probabilités pour que les gra-
ules soient bien réellement les ultramicrobes bactériophages.

2° Inoculation minime : dans ce cas le milieu se trouble de plus n plus avant que la lyse commence à s'effectuer.

Émulsion de SHIGA à 250 millions par cm³, inoculée avec 1/10 000 de cm³ une culture de Bactériophage (souche extrêmement active)
Après 1/2 h. (Trouble comme au début). Aspect normal d'une culture de [illegible]

Après 1 h (Trouble comme au début) Rares bacilles prenant mal la couleur Tous les bacilles sont de taille normale.

Après 2 h. (Trouble égal à deux fois ce qu'il était au début). Le fond de la préparation est chargé de débris informes. Tous les bacilles ont une coloration normale Très nombreux bacilles (2 sur 3 environ) ayant jusqu'à quatre fois la longueur des bacilles normaux ayant servi à préparer l'émulsion, avec tous les intermédiaires Formes ovales ou sphériques relativement nombreuses mais toutefois bien inférieures en nombre à ce que ferait supposer l'examen comparatif à l'ultramicroscope · ces formes sont d'ailleurs extrêmement fragiles et beaucoup doivent se détruire pendant l'étalement sur lame, pour les voir sur préparations colorées l'étalement doit être fait avec très grand soin

Après 3 h. (louche léger), tout le fond de la préparation est chargé de fins débris sans formes définies, avec, de place en place, de gros amas informes et de nombreuses granulations semblables à celles que l'on découvre dans les vieilles cultures de SHIGA normal Une seule forme sphérique vue après une dizaine de minutes de recherches Une douzaine de grands bacilles bien colorés par champs

Après 4 h (Très léger louche) Une douzaine de bacilles mal colorés par champs Le fond est semblable à celui de la préparation faite après 3 h : aucun corps sphérique

Après 5 h. (Presque limpide) Le fond est déjà moins chargé. Un bacille mal coloré par champs.

Après 6 h (Limpide) Le fond est bien moins chargé de débris On ne voit qu'un bacille mal coloré par 25 champs en moyenne.

Après 18 h. Rien de visible sur la préparation

Comme on le voit l'aspect de la préparation diffère peu de ce que nous avons vu dans le cas précédent ; il convient seulement de signaler que les bacilles qui se cultivent au début, avant que l'action des germes bactériophages se fasse sentir, présentent des formes anormalement grandes.

A l'ultramicroscope l'aspect a été à peu près semblable dans les deux cas : dans le dernier, où l'inoculation avait été faite avec une souche de Bactériophage anti-SHIGA extrêmement active, entre 2 h. et 3 h., moment où la lyse se faisait avec une grande intensité, les formes sphériques étaient particulièrement nombreuses : 2 à 3 par champs, et les éclatements faciles à observer ; la lyse une fois terminée, les plus minutieuses recherches ne permettent plus d'en découvrir.

C'est ici le cas de rappeler l'observation que j'ai déjà faite et qui s'adresse à ceux qui voudront expérimenter : quand il s'agit d'une action diastasique simple toutes les expériences faites dans des conditions identiques se déroulent suivant un rythme identique ; tel

n'est pas le cas ici, j'ai jusqu'à présent isolé plus de cent souches différentes du Bactériophage anti-SHIGA et je n'en ai pas encore trouvé deux qui fussent semblables. Le résultat final d'une expérience sera toujours celui que j'indique, les phases du phénomène se passeront dans le même ordre, mais les temps seront variables : avec telle souche de bactériophage la lyse totale sera obtenue en 3 h., avec telle autre après 12. Les phases se succéderont donc quatre fois plus rapidement dans le premier cas que dans le second.

Autre observation du même genre : tout ce qui a été dit jusqu'ici se rapporte à des souches du Bactériophage extrêmement actives, c'est-à-dire capables de produire la lyse totale : nous verrons d'ailleurs qu'elles ne sont pas difficiles à isoler.

En résumé, ce qu'il faut retenir des observations microscopiques, c'est qu'à aucun moment on ne peut distinguer sur préparations colorées, quel que soit le grossissement, de microorganismes autres que les bacilles de SHIGA. Outre les bacilles on ne voit que des débris bacillaires informes de plus en plus nombreux au fur et à mesure que devient plus complète la destruction des bactéries, débris qui se dissolvent ensuite peu à peu.

L'examen à l'ultramicroscope indique que les germes bactériophages se multiplient à l'intérieur même des bacilles, ce qui est d'ailleurs corroboré par toutes les expériences, et que ces germes bactériophages sont très vraisemblablement représentés par les très fines granulations qu'on observe tour à tour dans l'intérieur des bacilles et dans le liquide ambiant.

CHAPITRE II

,E BACTÉRIOPHAGE ET LA BACTÉRIE

ırulence du Bactériophage. Résistance de la bactérie. Cultures secondaires Instabilité des cultures mixtes. Caractères des cultures mixtes La bactérie résistante. Observations microscopiques. Acquisition de la résistance. Cultures multiples

VIRULENCE DU BACTÉRIOPHAGE

Dans le chapitre précédent nous avons pu nous rendre compte de complexité du phénomène que nous étudions, complexité qui ésulte du fait de la présence simultanée de trois éléments qui réaıssent les uns sur les autres : le milieu, le Bactériophage et la bac-'rie ; pourtant nous n'avons envisagé jusqu'ici que le cas le plus mple qui puisse se présenter, un Bactériophage au maximum de ırulence devant lequel la bactérie succombe toujours L'issue est ien souvent différente, et cela pour deux raisons : l'activité du Bac-:riophage n'est pas fixe, elle varie suivant une gamme qui va de action à peine décelable au pouvoir lytique le plus brutal ; la bac-:rie de son côté ne reste pas passive, elle se défend.

Nous avons déjà eu l'occasion de constater que l'activité du Bactéophage résulte d'une véritable virulence, au sens précis du mot : l'aptitude que possède un microbe à se développer dans le corps 'un organisme étranger et à y sécréter des substances toxiques ». 'e même qu'il existe pour chaque bactérie pathogène toute une ımme de virulence, de même chaque souche du Bactériophage ɔssède une virulence propre. Nous pouvons exalter ou atténuer la rulence d'une bactérie donnée, le même phénomène s'obtient avec Bactériophage. Enfin l'organisme supérieur parasité par une bac-

térie se défend et est susceptible d'acquérir l'immunité vis-à-vis de cette bactérie, la bactérie attaquée par le Bactériophage ne reste pas passive, elle lutte, elle peut vaincre et acquérir l'immunité. Toutes les péripéties de la lutte entre l'animal et la bactérie se retrouvent dans la lutte entre le Bactériophage parasite et la bactérie attaquée. La similitude est complète, nous descendons seulement d'un degré dans l'ordre de grandeur des êtres en présence.

C'est d'ailleurs le propre des êtres vivants de n'être jamais semblables à eux-mêmes à deux moments de leur existence : si la bactériolyse transmissible en série que nous étudions était d'ordre purement diastasique, l'action se déroulerait suivant un plan fixe, car l'élément actif ne pourrait varier qu'en quantité, sa qualité resterait dans tous les cas égale. Nous allons voir qu'au contraire, le phénomène est indépendant de la quantité d'élément actif mis en œuvre, ce qui le domine, c'est la qualité de cet élément actif ; c'est là précisément la caractéristique principale des actions vitales . un poison agit par sa masse, un microbe par sa virulence.

Comme nous l'avons déjà vu, un Bactériophage peu actif au sortir de l'organisme est susceptible d'exaltation par passages successifs aux dépens de la bactérie qu'il attaque. Pour bien juger de la différence que présentent entre elles diverses souches du Bactériophage, il est donc préférable de s'adresser à des souches qui viennent d'être isolées de l'organisme.

Exp. — A 10 cm³ d'une émulsion de bacilles de Shiga sont inoculés avec 1 cm³ d'un filtrat obtenu en partant des déjections d'un dysentérique, recueillies quelques heures avant le début de l'amélioration. L'émulsion est placée à 37°. Les numérations des ultramicrobes à divers moments donnent les résultats suivants

Quantité d'émulsion étalée sur gélose 1/100 de cm³

De suite . 16 plages, soit 1.600 ultramicrobes par cm³ d'emulsion. Le filtrat de déjection en contenait donc 16.000 par cm³.

Après 1 h. 15' : 40 plages, soit 4.000 ultramicrobes par cm³,

après 2 h. 30' . une dilution au 1/10 donne 42 plages, soit 42.000 ultramicrobes par cm³ ;

après 3 h. 45' une dilution au 1/100 donne 18 plages, soit 180.000 ultramicrobes par cm³ ;

après 5 h. : une dilution au 1/1 000 donne 4 plages, soit 400 000 ultramicrobes par cm³ ;

après 14 h. la lyse n'est pas totale, le milieu reste louche et louchit de plus en plus ; après 48 h. il est fort trouble . on a une culture abondante, sans qu'il y ait eu lyse [illegible] bactérie a donc acquis une certaine résistance qui lui a [illegible] malgré la présence du Bactériophage.

B. 10 cm³ d'émulsion de bacilles de SHIGA sont inoculés avec 1 cm³ d'un filtrat obtenu en partant des déjections du même dysentérique, recueillies 24 h plus tard, le patient entrant en convalescence

Les numérations successives donnent :

de suite 0 plage, donc moins de 100 ultramicrobes par cm³ d'émulsion ; le filtrat en contenait par conséquent moins de 1.000 par cm³,

après 1 h 15' 0 plage;

après 2 h. 30' 9 plages, soit 900 ultramicrobes par cm³,

après 3 h 45' numération sur une dilution au 1/10, 27 plages, soit 27.000 ultramicrobes par cm³

après 5 h . sur une dilution au 1/1000, 13 plages, soit 1 300.000 ultramicrobes par cm³,

Dans cette dernière expérience, les ultramicrobes étaient en très petit nombre dans le filtrat, certainement moins de 1.000 par cm³, c'est-à-dire 16 fois moins que dans le filtrat employé dans la première, et pourtant la lyse de l'émulsion a été complète en 10 h. et le liquide est resté indéfiniment stérile.

On doit remarquer que la multiplication des ultramicrobes a été beaucoup plus rapide dans la seconde expérience que dans la première, ce qui répond exactement à l'idée d'une virulence plus grande.

Ces expériences montrent que le nombre d'ultramicrobes inoculés n'influe nullement sur l'intensité du phénomène ; ce qui importe, c'est la qualité du Bactériophage, sa virulence

On doit remarquer également que les deux souches de Bactériophage provenaient du même individu et avaient été prélevées à 24 h d'intervalle : il s'agissait du même Bactériophage dont la virulence s'était exaltée *in vivo*.

Je pourrais citer un grand nombre d'expériences du même genre : on trouvera d'ailleurs à chaque page de cet ouvrage des faits qui montrent que le pivot du phénomène c'est la virulence du Bactériophage, virulence essentiellement variable, qui s'exalte, s'atténue, disparaît pour une bactérie donnée, suivant les conditions du moment. Cette variabilité extrême s'observe surtout *in vivo* à cause de la variabilité des conditions, elle est moindre *in vitro* où nous pouvons, dans une certaine mesure, réaliser une stabilité relative.

RÉSISTANCE DE LA BACTÉRIE

Dans la première des deux expériences qui viennent d'être citées, nous venons de voir que la bactérie est parvenue à se développer

malgré la présence du Bactériophage : la virulence propre du Bactériophage, quoique constituant le facteur principal du phénomène, n'est donc pas seule en cause : la bactérie est susceptible de résistance

Nous n'avons envisagé jusqu'ici que le cas de la lyse totale et permanente de l'émulsion bactérienne et j'ai spécifié que le phénomène ne revêtait cette forme que si le Bactériophage mis en œuvre possédait la virulence maxima et n'avait à agir que sur une quantité limitée d'émulsion, 10 à 20 cm³. Malgré que ces conditions soient remplies, il arrive de temps à autre qu'une émulsion dont la lyse s'était effectuée d'une manière normale, avec limpidité parfaite du milieu, se retrouble quelques jours plus tard. L'examen microscopique, sur lequel nous aurons à revenir longuement, montre que le trouble est produit par une culture bactérienne et les réactions biologiques donnent la preuve que cette culture est composée uniquement par des bactéries de même espèce que celles qui formaient l'émulsion sur laquelle on a fait agir le Bactériophage. Suivant la virulence de la souche du Bactériophage mise en œuvre, le nombre de tubes dans lesquels se produit cette repousse, cette culture secondaire (1), est plus ou moins grand

Les réensemencements sur gélose et en bouillon des émulsions lysées, dans lesquelles se produira plus tard une culture secondaire, restent stériles tant que cette culture secondaire ne s'est pas formée, ce qui ne se produit souvent que 5 à 6 jours après la lyse, parfois même davantage.

Exp — Emulsion de bacilles de SHIGA à 250 millions par cm³, inoculée avec 1/1000 de cm³ d'une culture du Bactériophage Lyse normale en 5 h., le milieu devient parfaitement limpide. Ensemencements sur gélose et en bouillon de l'émulsion lysée 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 jours après que la lyse a été complète . tous ces ensemencements restent parfaitement stériles. L'émulsion lysée se retrouble légèrement le huitième jour. Le neuvième jour, ensemencement d'une goutte sur trois tubes de gélose et dans un tube de bouillon . deux des tubes de gélose restent stériles, le troisième présente quatre petites colonies, le tube de bouillon donne une culture agglutinée en culot.

La résistance des diverses souches d'une même espèce bactérienne n'est pas constante, chaque souche paraît, au sortir de l'organisme,

(1) Pour faciliter l'exposition des faits, j'appellerai . culture secondaire, la repousse d'une émulsion lysée ; culture mixte, le réensemencement dans un milieu nutritif d'une culture secondaire avec coexistence dans le milieu de la bactérie et du Bactériophage.

posséder une individualité qui s'efface rapidement par cultures successives sur les milieux artificiels.

Dans l'expérience suivante j'ai fait agir la souche du Bactériophage la plus puissante que j'ai isolée, sur deux souches différentes du bacille de Shiga : une souche depuis longtemps entretenue en culture, utilisée à l'Institut Pasteur pour l'inoculation des chevaux fournissant le sérum antidysentérique (souche type) ; l'autre avait été récemment isolée des selles d'un dysentérique (souche Jerv.).

Exp. — 1. 12 tubes d'émulsion du bacille de Shiga type sont inoculés chacun avec 1/1.000 de cm^3 de culture d'une souche du Bactériophage entretenue depuis un grand nombre de générations toujours aux dépens de ce même bacille type lyse parfaite dans les 12 tubes, avec clarification complète du milieu en 4 heures. Après 3 jours à la température de 37° un de ces tubes se retrouble légèrement ; les 11 autres restent définitivement limpides.

5 autres expériences, portant chacune sur 12 tubes, même souche de Bactériophage, même souche de bacille, donnent les résultats suivants : nombre de tubes donnant une culture secondaire . 0, 2, 0, 3, 1.

Nous avons donc 7 cultures secondaires sur 60 émulsions · 12 o/o.

2 12 tubes d'émulsion préparée avec le bacille souche Jerv., aux dépens duquel la souche du Bactériophage en expérience ne s'est jamais développée, sont inoculés avec 1/1 000 de cm^3 de la même culture de Bactériophage que dans l'expérience précédente 7 sur ces 12 émulsions donnent des cultures secondaires. 5 autres essais fournissent 9, 5, 10, 5 et 6 cultures secondaires, soit 70 o/o.

8 jours plus tard, avec l'une des émulsions restées limpides, j'inocule 12 tubes d'émulsion du même bacille Jerv.. Cultures secondaires dans 5 tubes

Nouveau passage 8 jours plus tard 4 cultures secondaires sur 12 émulsions

Quatrième passage 8 jours après, toujours en prélevant le Bactériophage dans un tube resté limpide . 1 seul tube sur 12 présente une culture secondaire

3. Au début de la convalescence du dysentérique Jerv. j'isole de ses déjections un Bactériophage que j'essaye de la même manière sur le bacille type et sur le bacille Jerv., ce dernier provenant donc du malade lui-même mais isolé au début de la maladie, alors que son Bactériophage intestinal ne manifestait aucune activité vis-à-vis du bacille pathogène.

Bactériophage Jerv. sur bacille type · 4 cultures secondaires sur 12 émulsions lysées

Bactériophage Jerv. sur bacille Jerv. : 0 cultures secondaires sur 12 émulsions lysées Un nouvel essai sur 12 autres émulsions donne une culture secondaire

On voit que la virulence du Bactériophage anti-Shiga n'est pas égale pour toutes les souches du bacille de Shiga. Nous retrouverons

ce fait, encore plus marqué, pour d'autres bactéries : le bacille typhique, *B. coli*, *B. proteus*, par exemple. Chaque souche bactérienne, surtout au sortir de l'organisme, possède une individualité qui la rend plus ou moins résistante à l'action des souches du Bactériophage acclimatées à vivre *in vitro*. Nous allons voir que cette résistance s'exalte par un phénomène de sélection naturelle.

Tous les phénomènes dans lesquels intervient le Bactériophage, qu'ils se produisent *in vitro* ou *in vivo* (les premiers ne sont d'ailleurs que la reproduction expérimentale des seconds) sont dominés par ces deux facteurs : la virulence du Bactériophage et la résistance de la bactérie

ORIGINE DES CULTURES SECONDAIRES

Quel est le mécanisme intime qui régit la formation des cultures secondaires ? *A priori*, deux hypothèses peuvent se formuler. Deux facteurs sont en présence, le Bactériophage dont la virulence peut s'atténuer, la bactérie dont la résistance peut augmenter ; les cultures secondaires sont-elles dues à un affaiblissement de l'activité du Bactériophage ou bien existe-t-il, parmi les bactéries contenues dans l'émulsion, certains individus susceptibles d'acquérir l'immunité vis-à-vis du Bactériophage, ce qui provoquerait la formation d'une race résistante ? Les expériences suivantes tranchent nettement la question en faveur de cette dernière hypothèse.

Nous avons vu au chapitre traitant de l'isolement du Bactériophage que, dans la grande majorité des cas, les souches trop peu actives au sortir de l'organisme pour provoquer la lyse d'une émulsion bactérienne, et où la présence des ultramicrobes ne peut être primitivement décelée que par suite de la présence de plages sur gélose inclinée, étaient susceptibles d'acquérir par passages successifs une activité très grande permettant d'obtenir la lyse d'émulsions très chargées. Cette méthode des passages en série du Bactériophage qu'on oblige à se développer *in vitro* aux dépens d'une bactérie donnée, correspond exactement à la méthode pastorienne d'exaltation de la virulence d'une bactérie par passages successifs par un animal donné.

[illegible] cette expérience, que j'ai renouvelée un nombre consi[illegible] fois que j'ai isolé un Bactériophage [illegible]

peu actif d'un organisme, montre à elle seule que les cultures secondaires ne se produisent pas par suite d'une diminution de la virulence du Bactériophage, puisqu'il y a au contraire exaltation à chaque passage, même en l'absence d'une lyse macroscopiquement visible. D'ailleurs voici une expérience donnant la preuve directe.

Exp — Le contenu du tube ayant donné une culture secondaire dans l'expérience relatée à la page 53, est filtré sur terre d'infusoires puis sur bougie. 12 tubes d'émulsion de Shiga type sont inoculés chacun avec 1/1.000 de cm^3 de ce filtrat. Lyse parfaite dans les 12 tubes, permanente dans 11. Un seul se retrouble après 4 jours.

Les ultramicrobes bactériophages n'avaient donc rien perdu de leur virulence du fait de la culture secondaire. Ils coexistaient virulents à côté de bactéries devenues résistantes. La culture secondaire est donc le résultat d'un phénomène d'accoutumance de la part de la bactérie qui acquiert l'immunité vis-à-vis de son parasite.

Nous avons déjà vu que le nombre des ultramicrobes inoculés n'a aucune influence sur l'apparition des cultures secondaires, tout se réduit à une lutte où le nombre ne constitue qu'un facteur sans importance : ce qui importe c'est la virulence d'une part et l'aptitude à la résistance de l'autre.

Exp — 6 tubes contenant une émulsion de bacilles dysentériques à 250 millions par cm^3 sont inoculés avec des quantités variables d'une même culture de Bactériophage, avec les résultats suivants

1	0,1	cm^3 culture de Bactériophage	: lyse normale puis culture secondaire.
2.	0,02	cm^3 — —	lyse normale et permanente.
3.	0,004	cm^3 — —	. lyse normale et permanente.
4.	0,002	cm^3 — —	: lyse normale puis culture secondaire.
5.	0,0002	cm^3 — —	· lyse normale et permanente.
6	0,00002	cm^3 — —	lyse normale et permanente.

De plus les tubes donnant une culture secondaire s'intercalent dans les séries, au milieu de tubes où la lyse est définitive.

Exp. — Partie d'une série. Chaque tube de la série, contenant une émulsion de bacilles dysentériques à 250 millions par cm^3, est inoculé avec 1/1.000 de cm^3 de l'émulsion lysée du tube précédent. Passage chaque 24 h., c'est-à-dire quand le milieu est parfaitement limpide.

8.7 16. Emulsion + 0,001 cm^3 culture de Bactériophage : lyse permanente.
9.7.16. — + 0,001 cm^3 émulsion lysée du 8.7.16 : lyse permanente.

Moins un Bactériophage est virulent, plus est élevée la proportion de cultures secondaires, plus grand est par conséquent le nombre de bacilles susceptibles d'acquérir l'immunité.

La culture secondaire a pour origine un phénomène de sélection naturelle des bactéries les plus aptes à la résistance.

INSTABILITÉ DES CULTURES MIXTES

La culture mixte résulte d'un état d'équilibre entre la virulence de l'ultramicrobe bactériophage et la résistance de la bactérie. Mais ces deux facteurs sont essentiellement variables et leur intensité se modifie à chaque instant, influencés par les circonstances du moment. Nous pouvons même rompre l'équilibre en faveur de l'un ou de l'autre des organismes en présence.

Reportons, par exemple, une petite quantité d'une culture secondaire dans de l'eau physiologique ou, ce qui est préférable, dans du bouillon glycériné à 30 o/o, soit dans un milieu qui empêche la reproduction des bactéries et qui n'exerce pas d'action nocive sur l'ultramicrobe, l'équilibre est rompu en faveur du Bactériophage.

L'ultramicrobe est très sensible à l'action des acides : faisons quelques passages sur gélose glucosée, en partant d'une culture secondaire. La bactérie en se développant acidifiera peu à peu le milieu : l'équilibre sera finalement rompu en faveur de la bactérie ; le Bactériophage ne pouvant plus exercer son action parasitaire sera éliminé après quelques repiquages.

Nous avons vu que, dans le cas d'un Bactériophage peu virulent, l'addition du filtrat qui le renferme à du bouillon n'empêche pas la culture de la bactérie qu'on y ensemence : seuls les étalements sur gélose permettent de déceler la présence du Bactériophage par suite de l'apparition des plages caractéristiques. Pour exalter la virulence d'une telle souche peu active du Bactériophage nous avons vu qu'il faut effectuer des passages successifs aux dépens de la bactérie ; entre chaque passage il est nécessaire, soit de filtrer la culture mixte sur bougie pour séparer les ultramicrobes des bactéries, soit de chauffer vers 60° pour détruire ces bactéries tout en respectant les ultramicrobes.

Quelle est la raison de cette technique ? L'élimination des bactéries qui, au contact des ultramicrobes bactériophages, se sont défen-

ꞏs et ont acquis un certain degré de résistance qui leur permet de ꞏsister malgré l'exaltation progressive de la virulence de l'ultra-ꞏrobe : la résistance de l'une et la virulence de l'autre croissent lement. A chaque passage nous faisons donc agir des ultrami-bes de plus en plus virulents sur une émulsion de bactéries nor-les, c'est-à-dire dépourvues de toute résistance au moment où ꞏs les mettons en présence des ultramicrobes. Cette technique en mot, a pour but de s'opposer à la sélection naturelle des bacté-ꞏ résistantes.

CARACTÈRES DES CULTURES MIXTES

ꞏACTÉRIOPHAGE DE VIRULENCE FAIBLE. — Nous venons de voir ꞏquels moyens on pouvait rompre artificiellement l'équilibre qui ne dans les cultures mixtes Il est intéressant de laisser la lutte ꞏoursuivre et d'en constater l'issue dans des milieux ou chaque ꞏanisme agit par ses moyens propres, c'est-à-dire de laisser s'opé-la sélection naturelle des bactéries les plus aptes a la lutte. Pour a il nous suffit d'effectuer les passages en bouillon sans filtra-n ni chauffage intermédiaires. Dans le cas d'un Bactériophage ꞏ virulent c'est, *in vitro*, la bactérie qui finit généralement par ꞏmpher : la résistance augmente peu à peu, les germes les plus es survivent et se multiplient ; à un moment donné les ultrami-ꞏbes ne trouvant plus de bactéries attaquables cessent de se ꞏroduire et sont éliminés peu à peu de la culture qui, à partir de moment, n'est plus qu'une culture normale de la bactérie.

Dans certains cas s'établit un état d'équilibre plus stable et les ltures mixtes peuvent continuer à s'effectuer à travers un grand mbre de passages.

Ces cultures mixtes présentent souvent des alternances de cultu-ꞏ et de lyse partielle ; le milieu se trouble puis se clarifie plus ou ꞏins complètement pour se retroubler ensuite.

ꞏXP. Ensemencement en bouillon d'une colonie mixte (dysentérique-Bacté-phage) prélevée sur un tube de gélose inclinée ensemencée depuis treize ꞏls avec une culture secondaire.

Après 48 heures, trouble uniforme ;

ꞏprès 5 jours, milieu presque limpide ;

après 13 jours, trouble uniforme,
après 19 jours, liquide légèrement louche et petit dépôt;
après 1 mois, trouble uniforme et dépôt. Aspect définitif, le Bactériophage et la bactérie coexistent dans le milieu.

Les réensemencements en bouillon continuent à donner des cultures mixtes, troubles, à alternances moins marquées, quoique nettes, les alternances étant séparées par un intervalle de quelques heures seulement

Même expérience que ci-dessus effectuée avec une autre souche de Bactériophage anti-dysentérique Réensemencement d'une colonie, provenant d'une culture secondaire, âgée de deux mois

Après 3 jours, trouble uniforme,
après 5 jours, milieu presque limpide,
après 11 jours, milieu très louche,
après 18 jours, milieu limpide avec un très faible dépôt.

Tous les réensemencements restent stériles Le milieu renferme un Bactériophage très actif.

Dans ces cultures mixtes à alternances il y a lutte avec prédominance alternative du Bactériophage et de la bactérie; l'issue finale est tantôt en faveur du Bactériophage, tantôt en faveur de la bactérie, et cela après un nombre de passages extrêmement variable.

In vitro, l'issue de la lutte est généralement en faveur de la bactérie. Dans la seconde partie de cet ouvrage nous retrouverons, *in vivo*, les cultures mixtes avec alternances, et nous verrons que l'issue de la lutte fixe le sort de l'organisme supérieur au sein duquel elle s'effectue

Bactériophage de virulence extrême. — En présence d'un Bactériophage doué d'une extrême virulence les cultures secondaires sont relativement rares, quand elles se produisent, elles présentent un aspect très particulier : le milieu reste parfaitement limpide, la culture bactérienne s'effectue sous forme d'agglutinats, croissant lentement dans le fond du tube ou accolés aux parois. Ces agglutinats peuvent atteindre la grosseur de la tête d'une fine épingle, il est impossible de les dissocier par agitation.

Les reensemencements de ces cultures mixtes agglutinées donnent indéfiniment, semble-t-il, des cultures mixtes présentant le même aspect. J'en ai conservé de deux souches différentes (dysentérique-Bactériophage) pendant deux ans et demi et pendant ce temps j'ai effectué plus de cent passages successifs : j'ai vérifié la coexistence constante d'ultramicrobes extrêmement virulents et de bactéries complètement réfractaires à l'action de diverses souches de Bactériophage anti-dysentérique, toutes très virulentes. Dans ces

ultures mixtes il y a équilibre stable entre la virulence de l'un et a résistance de l'autre; on n'y observe jamais les alternances dont l a été question précédemment. On ne peut toutefois pas parler de ultures symbiotiques, car le Bactériophage ne peut continuer à se ultiver en série que s'il se reproduit et il ne peut se reproduire u'en parasitant des bactéries : d'ailleurs il suffit de rompre l'équiibre en faveur de la bactérie (nous avons vu quels sont les moyens employer pour y arriver), pour faire disparaître rapidement les ltramicrobes, désormais dans l'impossibilité de se cultiver.

Toutes les bactéries contenues dans une culture agglutinée se rouvent dans les agglutinats, aucune ne flotte libre dans le milieu : e ouillon ensemencé avec une goutte du liquide reste toujours stérile, la gélose ne donne aucune colonie; à l'examen microscopique on ne voit aucun élément figuré. Toutes les bactéries présentes sont donc rassemblées dans les agglutinats, le liquide limpide ne contient que des ultramicrobes extrêmement virulents, comme on peut le vérifier en inoculant une émulsion bactérienne qui est rapidement lysée Par contre, comme nous l'avons vu plus haut, le reensemencement en bouillon des agglutinats donne toujours naissance à ne culture mixte agglutinée.

Une culture mixte agglutinée ensemencée dans une culture pure de Bactériophage, c'est-à-dire dans une émulsion inoculée et parfaitement lysée, donne une culture agglutinée, comme si l'ensemencement avait été fait dans du bouillon neuf.

Si l'on introduit dans une émulsion de bacilles dysentériques quelques agglutinats, même lavés, on obtient la lyse de l'émulsion qui est complète en l'espace de cinq à six heures ; quatre à cinq jours plus tard, on voit apparaître de fins agglutinats qui grossissent peu à peu. Les ultramicrobes, contenus dans les agglutinats ensemencés, ont provoqué la lyse des bacilles normaux non résistants de l'émulsion, puis les bacilles résistants agglutinés se sont à leur tour reproduits et ont donné une culture comme s'ils avaient été ensemencés dans du bouillon stérile

On obtient tous les intermédiaires entre ces deux extrêmes : cultures mixtes troubles, présentant l'aspect d'une culture normale de la bactérie, où l'équilibre est essentiellement instable; cultures sous forme d'agglutinats dans un milieu parfaitement limpide, présentant un état d'équilibre stable. Le milieu peut être plus ou moins louche, les agglutinats plus ou moins compacts; on peut avoir des agglutinats peu denses, formant culot, avec un liquide plus ou

moins louche; la forme de la culture mixte est en rapport avec la virulence du bactériophage d'une part, la résistance de la bactérie de l'autre; l'aspect de la culture peut être aussi variable que sont variables les propriétés des deux organismes en présence.

COLONIES MIXTES SUR GÉLOSE. — Au lieu d'ensemencer les cultures mixtes en bouillon, nous pouvons les étaler sur gélose.

La gélose reste souvent stérile . l'équilibre y est rompu en faveur du Bactériophage, nous avons vu que ce fait se présentait également pour les réensemencements en bouillon, mais il est plus fréquent sur gélose. L'attaque des bactéries semble d'ailleurs, dans tous les cas, se faire plus facilement sur la gélose que dans les milieux liquides; cela peut tenir à plusieurs raisons la principale, sans doute, doit être la proximité des bactéries. Le premier acte de la lutte est certainement lié à un phénomène de chimiotaxie · dans un milieu liquide les bactéries en suspension sont séparées par des espaces considérables, eu égard aux dimensions d'un ultramicrobe; sur un milieu solide les bactéries au contraire se touchent, le passage des germes parasites de l'une à l'autre se fait plus facilement et la chimiotaxie n'a pas à s'exercer d'une manière aussi énergique pour amener le contact des deux organismes en lutte.

Quand une culture se produit sur gélose on obtient des colonies qui varient entre elles par l'aspect.

1° Des colonies normales de bacilles dysentériques (1). Elles s'observent surtout avec des cultures mixtes provenant d'émulsions inoculées avec un Bactériophage d'activité faible. Avec un Bactériophage très peu virulent, toutes les colonies peuvent même être des colonies normales.

2° De rares colonies uniquement formées de cocci et repiquables sous cette forme, soit en bouillon où on obtient une culture abondante avec trouble homogène, soit sur gélose où les colonies offrent un aspect un peu différent macroscopiquement de celles du bacille normal : elle sont plus bombées et plus opaques Les sous-cultures, obtenues par reensemencement de ces colonies ne sont pas des cultures mixtes, elles ne renferment que des cocci, à l'exclusion de germes bactériophages. La forme coccus se conserve pendant un

(1) Je prends toujours comme exemple le bacille dysentérique de Shiga pour faciliter les explications Toutes les autres bactéries donnent des cultures mixtes et des colonies mixtes présentant, à peu de chose près, des aspects semblables

:rtain nombre de générations, puis la bactérie reprend peu à peu ı forme normale.

3° Des colonies muqueuses, réfringentes, difficiles à dissocier, de ıille très différente, depuis la limite de visibilité jusqu'à environ mm. de diamètre; ces colonies sont repiquables sur gélose , elles redonnent des colonies de même forme. Ce sont des colonies ııxtes, on y constate toujours la présence simultanée de l'élément actérien et de l'élément bactériophage.

Même ensemencées largement sur gélose, ces dernières colonies e donnent jamais une culture en nappe, mais des colonies isolées lus ou moins nombreuses et toujours de taille variable . parmi 's bactéries ensemencées peu sont susceptibles de former une coloie, il y a toujours un état d'équilibre instable entre les deux fac:urs en présence, la bactérie avec sa résistance, le Bactériophage vec sa virulence; la bactérie forme ou ne forme pas une colonie, ıivant la prédominance accidentelle de l'un ou de l'autre de ces ıcteurs. On observe surtout ce fait quand on réensemence sur gélose es agglutinats : pour abondant qu'ait été cet ensemencement, on 'obtient jamais que de très rares colonies, toutes du type muqueux.

Voici quelques particularités concernant les cultures obtenues en ensemenınt ces colonies muqueuses sur divers milieux

par piqûre en gélose . petites colonies lenticulaires sur le parcours de ıiguille;

sur gélatine : même aspect que sur gélose, la bactérie résistante y reste ıvante et repiquable pendant au moins onze mois, ce qui, dans le cas du ıcille dysentérique de Shiga, représente une vitalité au moins dix fois plus ırte que pour la bactérie normale;

en gélatine par piqûre : grosses colonies lenticulaires à centre opaque,

sur pomme de terre glycérinée (préparée comme pour le bacille tuberculeux) · très rares colonies sur la pomme de terre, culture très abondante dans bouillon qui se trouve dans le fond du tube,

lait : n'est pas coagulé après 10 jours;

lait tournesolé : vire au mauve après 2 mois,

sérum coagulé . pas de culture;

rouge neutre : n'est pas modifié après 2 mois, en gélose ou en bouillon;

petit lait tournesolé . rougit après 10 jours et reste rouge.

Les colonies muqueuses émulsionnées et chauffées à 60° ne sont lus repiquables; le liquide ne contient plus comme élément vivant ue des ultramicrobes très virulents, qui ne sont tués que vers 65°.

Réensemencées en bouillon, les colonies réfringentes et muqueu- s mixtes donnent deux sortes de cultures : les cultures mixtes

louches à alternances et les cultures agglutinées que nous connaissons, tout dépend toujours du degré de virulence du Bactériophage et du degré de résistance de la bactérie qui règlent l'aspect de la culture.

Nous avons vu que si l'on introduisait un agglutinat, provenant d'une culture mixte à équilibre stable, dans une émulsion, on obtenait la lyse de cette émulsion puis une culture agglutinée. De même si l'on ensemence largement un tube de gélose inclinée avec le bacille de Shiga et si l'on dépose en un point un petit agglutinat, on obtient à cet endroit une plage, puis après trois ou quatre jours une colonie muqueuse au centre de cette plage Dans les deux cas le Bactériophage agit sur les bacilles normaux non résistants, les dissout, puis les bacilles réfractaires se cultivent comme ils l'auraient fait dans du bouillon ou sur de la gélose stérile.

LA BACTÉRIE RÉSISTANTE

De ce qui précède nous pouvons déjà déduire que l'acquisition de la résistance par la bactérie exerce une influence marquée sur sa morphologie : nous avons vu que certaines colonies sur gélose sont composées de bactéries offrant la forme coccus, d'autres colonies ont un aspect réfringent et une consistance muqueuse

Forme coccus. — Les expériences suivantes sont intéressantes, car elles permettent d'obtenir la forme coccus et le retour à la forme normale; la première dans la colonie elle-même à quelques jours d'intervalle, la seconde au cours de passages successifs

Exp. — On ensemence largement, en partant d'une culture de bacilles dysentérique sur gélose, une boîte de Petri qu'on place à l'étuve à 37° pendant environ 4 h, puis on dépose une goutte de culture du Bactériophage anti-dysentérique au centre de la boîte. Il faut choisir une souche de Bactériophage moyennement active, c'est-à-dire suffisamment pour produire régulièrement la lyse totale d'une émulsion, mais avec laquelle les cultures secondaires soient de règle; avec une souche trop virulente l'endroit où a été déposée la goutte reste définitivement stérile. La boîte de Petri est replacée à l'étuve. Après 18-24 h. on a une couche de culture formée de bacilles dysentériques normaux, présentant au centre, à l'endroit où a été déposée la goutte de culture du Bactériophage, une tache nue, d'apparence stérile Après 36-48 h. la tache se couvre de colonies extrêmement fines examinées au microscope

es sont uniquement constituées par des cocci, de tailles différentes, de 1 à ι de diamètre, de formes assez irrégulières, réunis en diplo, en tétrades. ux jours plus tard, un nouvel examen microscopique montre encore des :ci, mais on a en outre des formes bacillaires normales en grand nombre. s réensemencements sur gélose donnent toujours des colonies isolées, cha- e colonie reproduisant toujours le même aspect . culture cocciforme puis 'lange de cocci et de bacilles. Ces cultures renferment toujours, de plus, s ultramicrobes bactériophages

2° ELIAVA et POZERSKI ont indiqué un procédé qui permet d'obte- r des bactéries résistantes, cocciforme, sans mélange d'ultrami- obes, et pouvant se perpétuer sous cette forme pendant un certain ımbre de générations; le retour à la forme bacillaire s'obtient aduellement : après une quinzaine de repiquages on a de nouveau s cultures normales du bacille dysentérique sensible au Bacté-)phage.

A une émulsion bactérienne en bouillon, on ajoute 0,01 cm³ d'une culture du ctériophage anti, et on étale de suite une goutte de cette émulsion sur gélose :linée. Le milieu reste souvent stérile, comme nous l'avons vu au cha- .re précédent; parfois on obtient pourtant un léger liseré de culture, toujours ué sur l'extrême bord supérieur de la gélose, là où le milieu est légèrement əséché On prélève une parcelle du liseré que l'on étale sur un tube de lose stérile, on a, après incubation, une couche de culture parsemée de pla- s, on prélève de nouveau la semence pour un troisième passage à la partie périeure de la gélose, et on continue jusqu'à ce qu'on obtienne une culture raissant normale, c'est-à-dire ne présentant plus de plages On a alors une lture de bactéries résistantes, sans mélange de Bactériophage, présentant la ·me coccus

Dans ces cultures la résistance des bactéries se maintient pendant ι certain nombre de passages puis décroît peu à peu et on remar- ιe que la résistance est liée à la forme coccus, car l'allongement se oduit au fur et à mesure que la résistance à l'action du Bactério- ιage décroît.

La forme coccus peut encore s'obtenir d'une autre manière : cer- ιns tubes de gélose ensemencés avec une culture secondaire ınnent après un temps fort long, un, deux mois et même plus, ιe colonie, toujours située à la partie supérieure de la gélose. :tte colonie grossit peu à peu et après un an atteint un diamètre de us de 1 cm.; elle est uniquement formée de cocci. Il s'agit encore dubitablement de bactéries modifiées puisque des réensemence- ents successifs permettent de revenir à la forme bacillaire normale.

J'ai obtenu ces étranges colonies avec le bacille dysentérique, types SHIGA, FLEXNER et HISS, *B. coli* et les bacilles typhique et paratyphiques.

Comme on le voit, la forme coccus est certainement une forme de résistance de la bactérie et le retour à la forme bacillaire se fait peu à peu au fur et à mesure que diminue la résistance.

La transformation morphologique s'accompagne d'un changement profond dans les propriétés de la bactérie.

Les cultures en cocci, comme d'ailleurs les cultures secondaires et mixtes en général, ne sont plus agglutinables par un sérum spécifique. Le retour à l'agglutinabilité se produit en même temps que la perte de la résistance et le retour à la forme normale.

A ce propos j'ai vérifié que les bacilles typhiques inagglutinables au sortir de l'organisme étaient également des bacilles résistants à l'action du Bactériophage antityphique et qu'ils avaient perdu cette résistance quand, après quelques passages sur gélose, ils étaient devenus agglutinables. L'inagglutinabilité semble être une propriété des bactéries résistantes à l'action du Bactériophage.

La vitalité des bactéries résistantes est de beaucoup plus considérable que celle des bactéries normales. En ce qui concerne, par exemple, le bacille dysentérique de SHIGA dont la vitalité est faible (il y a bien peu de souches qui soient repiquables après un mois ; aucune, parmi les nombreuses souches que j'ai manipulées, ne l'était après deux mois), toutes les colonies sur gélose de SHIGA résistant sont encore repiquables après dix-huit mois.

La virulence des bactéries résistantes à l'action du Bactériophage est également plus considérable que celle des bactéries normales.

Quant à la nature des bactéries résistantes, quelle que soit leur forme, aucun doute ne peut subsister puisqu'on obtient le retour à la forme normale et aux propriétés normales : il s'agit bien de bactéries de même espèce que celles qui ont servi à préparer l'émulsion primitive et sur lesquelles on a fait agir le Bactériophage. En un mot il ne peut être question, ni d'une contamination accidentelle, ni de formes visibles du principe bactériophage.

J'ai effectué, avec une culture en cocci de la bactérie dysentérique de SHIGA, les réactions biologiques suivantes, qui indiquent que ces cocci conservent les propriétés générales du bacille dysentérique normal :

a. l'injection au lapin provoque la mort de l'animal avec para-

lysie du train postérieur et lésions intestinales identiques à celles qu'on observe chez les animaux morts à la suite d'une inoculation de bacille dysentérique type ;

b. les lapins préparés par des injections ménagées de ces cultures sont vaccinés contre une inoculation sûrement mortelle de bacilles dysentériques type,

c. les lapins vaccinés par des injections ménagées de bacilles dysentériques type, sont vaccinés contre l'injection d'une dose sûrement mortelle de ces cultures cocciformes ;

d. le sérum de lapins préparés par des injections ménagées de cultures de cocci contient une sensibilisatrice permettant la fixation de l'alexine sur les bacilles normaux.

Forme en zooglées. — L'examen microscopique des agglutinats formés dans les milieux liquides par les bactéries jouissant d'une grande résistance, ainsi que des colonies muqueuses sur gélose, montre que les bactéries (nous allons revenir dans un moment sur leur morphologie) y sont entourées d'une gangue muqueuse : il s'agit de véritables colonies zoogléiques.

Comme je l'ai dit plus haut, aucun doute n'est possible sur la nature même de ces bactéries, toutes les réactions biologiques montrent qu'il s'agit dans tous les cas de bactéries de même espèce que celles qui ont servi à préparer l'émulsion primitive ; on peut, de plus, dans tous les cas, revenir à la forme normale pure : il suffit d'éliminer le Bactériophage, cause de la mutation.

Nous voyons donc que la résistance de la bactérie à l'action du Bactériophage modifie profondément sa forme : la résistance s'accompagne du passage à la forme coccus ; si la bactérie, ayant à se défendre contre un Bactériophage extrêmement virulent, exalte sa résistance, il y a alors formation d'une capsule muqueuse qui a certainement pour objet d'empêcher la pénétration des ultramicrobes dans le corps bactérien : ces bactéries capsulées jouissent de l'état réfractaire.

La mutation s'accompagne de modifications dans les propriétés de la bactérie : vitalité considérable, virulence exaltée, inagglutinabilité par les sérums spécifiques

La résistance se maintient tant que la bactérie doit résister à l'action du Bactériophage : en l'absence d'ultramicrobes la résistance baisse peu à peu et d'autant plus rapidement qu'elle etait moindre ;

ıs les cas extrêmes, elle disparaît après une trentaine de passages · gélose, ce qui représente toutefois un nombre considérable de ıérations.

OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

On observe dans les agglutinats et les colonies zoogléiques cerines formes étranges qu'on retrouve, quoique bien moins abonıntes, dans les cultures mixtes en général.

L'examen microscopique sur préparations colorées à la thionine ı au Giemsa montre des formes différentes suivant qu'il s'agit de ›lonies jeunes ou âgées. Jusqu'au deuxième ou au troisième jour polymorphisme est considérable, à côté de formes bacillaires type de cocci, on voit des formes bacillaires très allongées ayant jusı'à 15 μ de longueur, avec tous les intermédiaires, droites ou ;courbées suivant des angles divers; puis des formes en massues, ı levures, des granules plus ou moins fins et enfin des débris rovenant de la destruction de ces différentes formes, avec égaleıent tous les intermédiaires entre les formes intactes et les débris ıformes. Quelle est la signification exacte de ces formes variées? Ce ɔnt des formes d'involution ou de résistance de la bactérie : c'est ›ut ce qu'il est actuellement possible de dire. Il est certain d'autre art que quelques-unes de ces formes donnent l'impression nette u'on se trouve en présence d'un organisme se reproduisant par ɔorogonie.

Dans les colonies âgées on ne voit plus guère que les formes acillaire et coccus.

On peut multiplier les isolements sur gélose, l'aspect est toujours ɜ même, et, quelles que soient les colonies repiquées, les épreuves iologiques dont j'ai parlé montrent qu'il s'agit toujours de la bac-ɜrie en cause; la possibilité du retour à la forme bacillaire pure ar culture sur gélose sucrée montre de plus qu'à aucun moment il 'y a eu contamination par un organisme étranger.

Quelle explication donner à ces faits? Au début j'avais envisagé hypothèse de la présence dans les cultures secondaires de formes isibles du Bactériophage. Les expériences exposées m'en ont émontré la fausseté. J'ai alors été amené à envisager une seconde

hypothèse que je n'ai malheureusement pas eu le temps d'étudier comme il aurait convenu : le sujet est tellement vaste que j'ai préféré consacrer mon temps à des expériences touchant le rôle du Bactériophage plutôt que de m'attacher au côté morphologique de la question. Je soumets donc simplement cette hypothèse, qui s'appuie sur des observations, aux savants particulièrement compétents en matière de recherches morphologiques.

La nécessité de l'intervention d'une bactérie pour la production des asques chez certains champignons (1) est un fait connu en mycologie. Le même fait se produirait-il pour les bactéries résistant au parasitisme (2) ?

L'hypothèse que j'émets est d'autant moins invraisemblable que pour SHAUNDINN la sexualité est un caractère fondamental de la matière vivante ; il a observé chez *B. butschlii* et *B. sporenema* (en plus du mode de reproduction ordinaire par division transversale), une reproduction par autogamie, ce qui implique une sexualité rudimentaire : dans l'autogamie, ce sont en effet des éléments nécessairement différenciés qui se fusionnent. D'après SHAUNDINN la perte de la sexualité chez les bactéries serait l'indice d'une dégradation survenue à la suite d'une adaptation au parasitisme. Suivant l'hypothèse que j'émets, il se produirait un retour à la reproduction sexuée sous l'influence du parasitisme subi et comme moyen de défense. La reproduction sexuée serait donc extrêmement fréquente *in vivo*, aussi fréquente en fait que l'est, dans l'organisme, la lutte entre le Bactériophage et des bactéries. Nous verrons dans la seconde partie de cet ouvrage que cette lutte est continuelle.

ACQUISITION DE LA RÉSISTANCE

Pouvons-nous nous rendre compte du mécanisme de l'acquisition de l'immunité par une bactérie ? De nombreuses expériences m'ont montré que si l'on introduit dans une émulsion relativement char-

(1) Par exemple . *Ascobolus furfuraceus* (MOLIARD, 1903) ; levure du genre *Willia* (SARTORY, 1902) un *aspergillus* croissant sur la banane (SARTORY, 1920)

(2) Voici un fait qui tendrait à montrer que sous l'influence du Bactériophage les bactéries non-sporulées donnent des formes filtrantes . j'ai constaté à plusieurs reprises qu'un filtrat obtenu en passant une culture secondaire à

;ée en bacilles (de un à deux milliards par cm³), une certaine quan-
ıté d'une culture d'un Bactériophage peu actif, les ultramicrobes, 'acilement décelables au début par suite de la présence de plages sur es étalements sur gélose, disparaissent du milieu après un intervalle de temps variant de 1 h. à 2 ou 3 jours et ne se retrouvent plus par la suite : les réensemencements donnent des cultures normales de la bactérie. Nous avons vu d'autre part que dans le cas d'un Bactériophage très virulent les ultramicrobes disparaissent du liquide entre 10 et 20 minutes après l'inoculation de l'émulsion, mais reparaissent en nombre environ 20 fois plus considérable 1 h. à 1 h. 1/2 plus tard : ils se sont cultivés à l'intérieur des bactéries Dans le cas d'un Bactériophage peu virulent il semble donc qu'il y ait également pénétration des germes à l'intérieur des bactéries, mais alors la culture ne peut s'effectuer, la bactérie résiste et l'ultramicrobe est finalement détruit *in vivo*. Il est vraisemblable, que ces bactéries parasitées qui « guérissent », acquièrent par là même l'immunité.

Voici d'ailleurs un autre fait que j'ai parfois observé et qui montre que certains bacilles peuvent devenir des « porteurs ». Comme je viens de le dire, les émulsions chargées qui ont été inoculées avec un filtrat contenant un Bactériophage peu virulent donnent après quelques heures des cultures sur gélose absolument normales et ne présentant aucune plage. Si l'on repique en série ces cultures, en étalant la semence de manière à obtenir une culture en nappe, il arrive parfois qu'après un certain nombre de repiquages on observe une plage très nette, qui est bien constituée par une colonie de Bactériophage car, en partant de cette plage, on peut, par passages successifs obtenir finalement un Bactériophage très actif. D'où pouvait provenir cet ultramicrobe apparaissant tout à coup? Un ultramicrobe s'était conservé vivant dans un bacille et, à un moment donné, a pu vaincre la résistance de ce dernier et se reproduire; la virulence s'est exaltée, les germes jeunes ont pu parasiter les bacilles voisins et former une colonie. Aucune autre explication ne semble possible, puisque, de suite après l'inoculation du Bactériophage, l'ensemencement sur gélose montre les plages caractéristiques de la présence de germes bactériophages virulents; puis ces germes dis-

la bougie Chamberland L2 et même L3, se troublait après quelques jours. Chaque fois que le fait s'est produit ce trouble était dû à une culture de la bactérie résistante qui se trouvait, avant filtration, dans la culture secondaire. N'ayant pas encore réussi à fixer les conditions de la production du phénomène, je me borne à signaler le fait, sans insister.

paraissent totalement (les bacilles restant pourtant sensibles à l'action d'un Bactériophage plus actif car on obtient la lyse parfaite si on inocule cette émulsion avec une trace d'une culture du Bactériophage très actif) ; enfin réapparition d'un germe bactériophage actif après une série d'ensemencements sur gélose au cours de laquelle toutes les cultures bacillaires ont été normales. Ce germe ne pouvait être que l'un de ceux qui avaient disparu ; le fait, démontré par l'expérience, de la pénétration des ultramicrobes virulents dans les bactéries, nous autorise à penser que cet ultramicrobe peu virulent s'est conservé à l'état de vie latente également à l'intérieur d'une bactérie : à un moment donné la résistance de la bactérie a fléchi, l'infection s'est déclarée.

CULTURES MULTIPLES

Il nous reste à considérer le cas des cultures multiples. Nous allons voir dans le chapitre suivant que la virulence d'une souche de Bactériophage se limite rarement à une seule espèce bactérienne. Quelle forme prendront les cultures secondaires si l'on fait agir le Bactériophage sur une émulsion composée de diverses espèces bactériennes ? Limitons-nous à l'examen du cas le plus simple, un Bactériophage agissant sur deux espèces bactériennes.

Je prends comme exemple une souche de Bactériophage très virulente pour le bacille de Shiga, très peu virulente pour *B. coli*, comme le montre l'expérience suivante.

Exp. — Trois tubes de bouillon sont additionnés respectivement de 1/100, 1/10 et 1 cm³ de la culture du Bactériophage anti-Shiga en expérience ; ces trois tubes sont ensuite légèrement ensemencés avec *B. coli*. Cultures normales dans les trois tubes : les étalements sur gélose donnent quelques plages.

Chacune des trois cultures est repiquée dans du bouillon neuf : culture normale de *coli*. Les étalements sur gélose donnent deux plages pour le premier tube, rien dans les deux autres.

La culture ayant donné deux plages est repiquée : culture normale, le Bactériophage a été éliminé.

Cette souche de Bactériophage anti-Shiga possède donc une virulence extrêmement faible pour *B. coli*.

Exp. — 10 cm³ de bouillon sont additionnés de 1 goutte d'une émulsion concentrée de bacilles de Shiga de manière à obtenir un louche faible correspondant à environ 50 millions de bacilles par cm³, et de 1 goutte d'une émulsion également concentree de *B. coli* Cette émulsion double est ensuite inoculée avec 1/100 de cm³ de la culture du Bactériophage anti-Shiga en question

Après 24 h. : louche fort. Une goutte de cette culture double mixte est ensemencée dans 10 cm³ d'une émulsion légère double Shiga-*coli*

Après 24 h . louche léger. Nouveau passage dans une émulsion double Shiga-*coli*, qui est parfaitement lysée après 11 heures

L'émulsion lysée est alors introduite, à la dose de 1/25 de cm³, dans une émulsion simple de *B coli* lyse parfaite en 7 h.

Les ultramicrobes se sont cultivés aux dépens des bacilles de Shiga, ils se sont donc maintenus dans le milieu et ont pu, peu à peu, accroître leur virulence pour les bacilles *coli*.

Dans l'intestin le Bactériophage ne se trouve jamais en présence d'une seule espèce bactérienne . cette expérience nous permet de comprendre le processus de l'acquisition *in vivo* de la virulence du Bactériophage pour une bactérie donnée.

CHAPITRE III

VIRULENCE DU BACTÉRIOPHAGE

Virulences multiples Persistance de la virulence
Espèces bactériennes attaquées

VIRULENCES MULTIPLES

Une souche quelconque du Bactériophage est rarement active au sortir de l'organisme vis-à-vis d'une seule espèce bactérienne : elle attaque généralement un certain nombre d'espèces à la fois et possède pour chacune d'elles une virulence variable.

On pourrait objecter que rien ne s'oppose à la conception de la pluralité des espèces du genre Bactériophage, chaque espèce agissant contre une bactérie déterminée. Nous étudierons cette question en détail au cours du chapitre suivant, j'indiquerai seulement pour l'instant que toutes les expériences sont en faveur de l'unicité, y compris la réaction de fixation du complément, quelle que soit la provenance du Bactériophage

Le Bactériophage est un, mais il existe des infinités de souches différentes possédant chacune, au sortir de l'organisme, le pouvoir d'attaquer diverses bactéries. Telle souche possèdera, par exemple, une virulence très grande vis-à-vis du bacille dysentérique de Hiss, moyenne vis-à-vis de *B. coli*, faible vis-à-vis du bacille dysentérique de Shiga, très faible vis-à-vis du bacille paratyphique B, nulle (1) pour les autres bactéries intestinales essayées. Telle autre

(1) Il est évident que lorsque j'indique qu'une souche de Bactériophage ne possède aucune virulence vis-à-vis de telle ou telle bactérie, il reste sous-entendu « pour autant que la technique actuelle permette de le constater ». Au début de mes recherches je ne parvenais à déceler que les souches douées

ouche sera très active vis-à-vis de *B. coli* et du bacille typhique, ès peu active vis-à-vis du bacille dysentérique de Hiss, inactive s-à-vis des autres bactéries essayées.

Il est pratiquement impossible de faire l'analyse complète d'une ouche du Bactériophage car il faudrait la faire agir sur toutes les pèces bactériennes connues, et inconnues, pour pouvoir détermi-er son activité vis-à-vis de chacune d'elles. Etant donné un filtrat réparé avec des déjections, nous pouvons affirmer que le Bactério-hage s'y trouve du moment que nous vérifions sa présence par ite d'une activité manifestée vis-à-vis d'une bactérie quelconque; ar contre nous ne pouvons jamais conclure qu'il ne s'y trouve pas u fait que les essais restent négatifs. Recherchant l'activité du actériophage intestinal dans un filtrat préparé avec les déjections un homme sain, j'obtins un résultat négatif en l'essayant sur les actéries intestinales vis-à-vis desquelles je pouvais m'attendre à voir ette activité se manifester; je poursuivis la recherche sur les bacté-es les plus variées, finalement je pus isoler une souche de Bacté-ophage active vis-à-vis d'une salmonella (bacille du Hog-choléra), ouche que je réussis à cultiver en série : le Bactériophage était onc bien présent.

Une même souche de Bactériophage est essentiellement variable ans le temps, soit dans l'organisme même, ce que l'on vérifie en olant chaque jour le Bactériophage des déjections d'un malade au ours de la maladie et de la convalescence, soit *in vitro*, comme ous l'avons vu au cours du chapitre précédent.

Toutes les combinaisons de virulence étant possibles, en quantité omme en qualité, c'est-à-dire en étendue d'action vis-à-vis de bac-ries variées et en intensité d'action pour chacune des bactéries taquées, on comprend, vu le nombre infini de combinaisons pos-bles, qu'il n'existe pas deux souches de l'ultramicrobe bactério-age qui soient identiquement semblables.

PERSISTANCE DE LA VIRULENCE

La faculté pour une souche du Bactériophage du retour au para-isme vis-à-vis d'une bactérie persiste à travers un très grand

une activité considérable, toutes les autres passaient inaperçues. J'ai depuis rfectionné la technique, pourtant elle n'est certainement pas encore parfaite.

nombre de passages effectués, *in vitro*, aux dépens d'une autre espèce bactérienne. Par exemple, j'ai isolé en 1916 un Bactériophage extrêmement actif vis-à-vis du bacille dysentérique de SHIGA, moyennement actif pour *B. coli*, très peu actif pour les bacilles typhique et paratyphiques. Cette souche, qui m'a servi pour de nombreuses expériences, a subi au cours des années 1916, 1917, 1918 et 1919 de très nombreux passages, toujours aux dépens du bacille dysentérique, soit plus de 1.200 ; or, au début de 1920 j'ai vérifié qu'elle possédait encore une virulence moyenne pour *B. coli* et une virulence faible pour le bacille typhique

L'action sur le bacille typhique d'un Bactériophage ayant subi plus d'un millier de passages aux dépens de bacilles dysentériques est évidemment faible et pour la constater il convient de la vérifier par l'étalement sur gélose qui permet d'obtenir les plages caractéristiques Introduisons dans un tube de bouillon une dizaine de gouttes de la culture de Bactériophage anti-dysentérique, ensemençons ensuite avec une faible quantité de bacilles typhiques. Après 18-24 h. d'étuve, on obtient une culture de bacilles typhiques qui paraît normale, mais si on en étale une goutte sur la gélose on obtient quelques plages.

Voici une autre observation du même ordre, faite par G ELIAVA, encore plus typique, car il s'agit d'une action croisée s'exerçant sur des bactéries très éloignées l'une de l'autre. Une souche du Bactériophage, isolée primitivement d'un pus d'abcès (nous verrons que dans certaines circonstances le Bactériophage intestinal est susceptible de passer dans la circulation), très active vis-à-vis du staphylocoque doré, s'est montrée, après une série de plus de cent passages, toujours aux dépens du Staphylocoque, douée d'une certaine activité vis-à-vis du bacille dysentérique.

EXP 10 cm^3 d'une émulsion de bacilles de SHIGA sont additionnés de 1/4 de cm^3 d'une culture filtrée du Bactériophage anti-staphylococcique; l'étalement immédiat sur gélose donne une culture normale de bacilles dysentériques; après que l'émulsion est restée 24 heures à l'étuve à 37°, l'étalement sur gélose de 1/50 de cm^3 de cette émulsion donne quatre plages. Des passages successifs aux dépens du bacille dysentérique permettent d'exalter cette virulence

Ces expériences nous permettent de pénétrer plus avant dans le phénomène de la virulence du Bactériophage. Nous avons introduit dans les émulsions, soit de bacilles typhiques, soit de bacilles

dysentériques, plusieurs centaines de millions d'ultramicrobes, tous virulents pour le bacille de SHIGA dans le premier cas, pour le staphylocoque dans le second. Chaque plage sur la gélose représentant une colonie issue d'un ultramicrobe virulent, dans un cas pour le bacille typhique, dans l'autre pour le bacille dysentérique, nous voyons que sur plusieurs centaines de millions d'ultramicrobes, quelques unités seulement se sont trouvées douées d'une virulence latente suffisante pour parasiter la nouvelle bactérie qu'on leur offrait et se multiplier à ses dépens.

La persistance de la virulence latente est l'apanage de certains individus particulièrement aptes. A chaque passage suivant, aux dépens de la nouvelle bactérie, ces individus se multiplient, leur virulence s'exalte et on obtient finalement après quelques passages, une lyse totale de l'émulsion.

La persistance de la virulence latente chez une souche du Bactériophage n'est pas égale pour toutes les bactéries. Le Bactériophage intestinal se maintient dans l'intestin aux dépens des divers bacilles intestinaux : le Bactériophage est donc en réalité un parasite normal des bactéries du groupe coli-typhique-dysentérique et un parasite accidentel des autres bactéries vis-à-vis desquelles il acquiert la virulence dans l'organisme même, à la faveur de conditions encore indéterminées. On comprend donc qu'un Bactériophage actif au sortir de l'organisme pour une bactérie très éloignée du groupe coli-typhique-dysentérique, pour un staphylocoque par exemple, gardera très longtemps, sans doute indéfiniment, le pouvoir d'attaquer une bactérie de ce groupe, et cela malgré de très nombreux passages aux dépens de la bactérie attaquée accidentellement. Au contraire, un Bactériophage possédant au sortir de l'organisme la virulence pour une bactérie accidentellement attaquée, perdra plus ou moins rapidement cette virulence s'il vient à être entretenu *in vitro* aux dépens d'une bactérie normalement attaquée, c'est-à-dire aux dépens d'une bactérie du groupe coli-typhique-paratyphique.

On pourrait objecter que tous ces faits peuvent s'interpréter, non pas par la persistance d'une virulence latente, mais par la persistance, à travers les passages successifs, de plusieurs espèces de Bactériophages ; en d'autres termes, d'une « contamination » du Bactériophage anti-dysentérique par des ultramicrobes bactériophages anti-typhiques dans le premier exemple cité ; d'une « contamination » du Bactériophage anti-staphylococcique par des ultramicrobes bactériophages anti-dysentériques dans le second.

L'expérience et le raisonnement mathématique montrent qu'une telle interprétation serait fausse

Dans le premier exemple cité, j'ai vérifié que le nombre d'ultramicrobes virulents pour le bacille typhique ne varie guère au cours des passages le nombre de plages obtenues sur gélose par l'étalement d'une émulsion de bacilles typhiques inoculée avec une culture du Bactériophage antidysentérique est sensiblement le même, que ce Bactériophage ait subi cinquante, cent, cinq cents ou mille passages aux dépens du bacille dysentérique. Si les ultra-microbes susceptibles d'attaquer les bacilles typhiques constituaient une « impureté », leur nombre diminuerait peu à peu au cours des passages, chaque passage étant une dilution, et ils disparaîtraient rapidement.

Si l'on calcule le taux de la dilution, après mille passages, du filtrat primitif qui a été le point de départ de la culture de la souche du Bactériophage en question, on trouve un chiffre tellement incommensurable que la persistance de germes bactériophages anti-typhiques, à travers cette série de dilutions successives, constitue une impossibilité mathématique. On calcule en effet facilement qu'au millième passage (chaque passage étant effectué sur 10 cm^3 d'émulsion bactérienne inoculés avec 1/1000 de cm^3 du tube précédent), le taux de la dilution dans le millième tube de la série est donné, en kilomètres cubes, par le chiffre 10^{1982}. Pour apprécier ce chiffre incommensurable, qu'il suffise de dire qu'au vingt-deuxième passage seulement, la goutte du filtrat primitif provenant des déjections se trouve déjà diluée dans un nombre de kilomètres cubes de liquide exprimé par le nombre 10^{70}, c'est-à-dire par un nombre dont le logarithme a pour caractéristique 70 il ne s'agit de rien de moins que d'un cube de liquide tel, qu'il faudrait à un rayon de lumière un milliard de siècles pour en parcourir une arête (1).

L'action ne peut donc s'expliquer par une persistance à travers

(1) Il est évident que le même raisonnement mathématique démontre que le Bactériophage lui-même est un être vivant. Si l'on voulait expliquer la lyse par la présence d'une diastase lytique dans les déjections (ou, ce qui revient en réalité au même, par la présence d'un co-ferment ou d'un catalyseur contenu dans les déjections et activant une prodiastase lytique contenue dans la bactérie), la diastase, de même que le catalyseur ou le co-ferment, seraient rapidement éliminés du fait de la dilution. Supposer possible la persistance de l'un de ces principes, malgré la dilution qui tend vers l'infini, et sa présence en chaque point d'une masse incommensurable de liquide, c'est douer

les cultures successives de germes bactériophages anti-typhiques.

Suivant la conception de Maurice NICOLLE, une bactérie peut être considérée comme une mosaïque de propriétés ; chacune de ces propriétés : vitalité, résistance à la chaleur, virulence vis-à-vis de tel ou tel animal, etc., est susceptible, chez un même individu, de variations continuelles. Dans une culture d'une bactérie quelconque il n'existe pas à un moment donné deux bactéries présentant exactement les mêmes propriétés Cette conception, démontrée par l'expérience journalière, s'applique d'ailleurs à tous les êtres vivants : la variation, c'est-à-dire la propriété de s'adapter, étant l'essence même de la vie et exclusivement de la vie Comme tout être vivant, le Bactériophage s'adapte continuellement et dans une culture aucun des ultramicrobes qui la composent ne possède exactement les mêmes propriétés ; les uns sont susceptibles d'une rapide adaptation vis-à-vis d'une bactérie donnée, les autres vis-à-vis de telle autre : un ultramicrobe bactériophage est une mosaïque de propriétés.

Lorsqu'un Bactériophage est virulent au sortir de l'organisme pour plusieurs bactéries à la fois, ce qui est le cas ordinaire, on voit que la virulence qu'il possède pour chacune de ces bactéries est sujette à variations avec le temps, et cela qu'il soit conservé, en tubes cellés, dans les déjections mêmes, ou dans les filtrats provenant de ces déjections.

Certaines souches du Bactériophage perdent plus rapidement que d'autres, *in vitro*, la virulence pour une bactérie vis-à-vis de laquelle elles étaient actives au sortir de l'organisme.

EXP. Selles Mor , typhique, début de la convalescence Le 20 août 1918, ces selles sont traitées suivant la technique décrite. Le filtrat est réparti, à raison de 0,5 cm³, dans des émulsions des bactéries suivantes : SHIGA, typhique, paratyphiques A et B, coli Après 24 heures d'étuve ces émulsions sont étalées sur gélose, avec les résultats suivants :

Emulsion de bacilles de	SHIGA . .	gélose stérile.
—	typhiques	gélose stérile.
—	paratyphiques A.	plages nombreuses.
—	paratyphiques B.	plages nombreuses.
—	coli.	gélose stérile.

e principe du don métaphysique de l'ubiquité Toute conception de la bactériolyse transmissible en série, qui n'admet pas un être vivant autonome omme origine du phénomène, aboutit à une absurdité mathématique.

Je conserve, en tubes scellés, un échantillon des déjections et un du filtrat le 22 janvier 1919, soit cinq mois plus tard, je pratique un nouvel examen les déjections et du filtrat.

		déjections	filtrat
		—	—
Emulsion de	b. Shiga	gélose stérile	gélose stérile.
—	b. typhiques.	culture normale	culture normale.
—	b paratyphiques A	culture normale	culture normale.
—	b paratyphiques B.	plages nombreuses.	plages nombreuses
—	b coli.	plages nombreuses	plages nombreuses

La virulence s'est maintenue intacte pendant cinq mois pour le bacille dysenterique et le paratyphique B, elle a diminué pour *B. coli*, elle a disparu pour le bacille typhique et le paratyphique A.

A noter que le résultat a été le même, que le Bactériophage se soit conservé directement dans les selles ou dans le filtrat, c'est-à-dire dans du bouillon. A noter également que le degré de virulence n'influe pas sur la conservation ou la disparition de cette virulence : elle était forte pour le bacille typhique et elle est devenue nulle, tandis qu'elle était faible pour le bacille paratyphique B et elle s'est maintenue intacte.

En l'absence de passages, simplement par l'effet du vieillissement, la virulence du Bactériophage varie donc avec le temps et cela d'une manière différente pour les diverses bactéries attaquées elle s'atténue plus vite pour les unes que pour les autres, sans qu'il soit d'ailleurs possible de fixer une règle générale. Nous avons vu plus haut qu'avec une autre souche, après quatre ans et malgré les passages aux dépens du bacille dysentérique, la virulence s'était conservée pour le bacille typhique. La dernière expérience citée n'est donc intéressante qu'en ce qu'elle montre que l'atténuation de la virulence qui se produit avec le temps, ne suit pas une marche parallèle pour les diverses bactéries attaquées par un même Bactériophage.

BACTÉRIES ATTAQUÉES

Nous allons passer en revue les diverses bactéries pour lesquelles j'ai isolé jusqu'ici des souches actives du Bactériophage (1) Je n'é-

(1) Dans certains cas le Bactériophage peut servir pour l'identification des

numérerai pour chacune d'elles que les particularités que peut présenter le phénomène dans le cas particulier de cette Bactérie. En ce qui concerne les caractères généraux, toutes sont semblables, c'est-à-dire que ce qui a été dit dans les chapitres précédents quant à la technique de l'isolement, au mode d'action, à la virulence variable, à l'exaltation de la virulence par passages, à la résistance des bactéries et aux cultures secondaires, s'applique à toutes les souches du Bactériophage et à toutes les bactéries attaquées. Dans toutes les expériences citées jusqu'à présent j'ai pris le bacille dysentérique comme exemple, mais j'ai vérifié que toutes ces expériences pouvaient être répétées avec un résultat identique en prenant une bactérie quelconque et la souche du Bactériophage active vis-à-vis de cette bactérie. Le bacille dysentérique présente pour les expériences un avantage pratique : c'est contre lui, comme nous le verrons, qu'il est le plus facile d'isoler des souches très actives du Bactériophage, ce qui permet à tout bactériologue de répéter les expériences sans avoir à effectuer de longues recherches préliminaires.

Bacille dysentérique de Shiga. — C'est la bactérie contre laquelle il est le plus facile d'isoler des souches très actives du Bactériophage. Le Bactériophage anti existe, pour ainsi dire normalement, dans l'intestin de nombreux animaux, le cheval et les oiseaux de basse-cour en particulier ; il est également très fréquent chez l'homme et peut acquérir une forte virulence, non seulement au déclin d'une dysenterie, mais encore au déclin de nombreux états pathologiques. J'en ai isolé jusqu'à ce jour environ deux cents souches, sans en trouver deux exactement semblables comme virulence et comme étendue d'action sur les bactéries voisines du groupe coli-typhique-dysentérique. Parmi ces deux cents souches, une seule, d'activité moyenne au sortir de l'organisme, ne touchait à aucune autre bactérie de ce groupe

bactéries, au même titre que l'agglutination. Pour cet usage il suffit de posséder des souches du Bactériophage ayant subi de nombreux passages aux dépens d'une même bactérie, de manière à affaiblir, autant que possible, les virulences accessoires. Par exemple toute bactérie qui se lysera sous l'influence d'une souche de Bactériophage ayant subi de nombreux passages aux dépens du bacille de Shiga, sera certainement un bacille de Shiga. Pour certaines espèces, le bacille pesteux, par exemple, pour lesquelles l'action du Bactériophage entraîné paraît plus spécifique, la diagnose au moyen du Bactériophage sera tout particulièrement concluante.

Une souche du Bactériophage active pour le bacille dysentérique de SHIGA, l'est en général également pour *B. coli* et les bacilles dysentériques type FLEXNER et HISS.

Le bacille dysentérique type SHIGA constitue au point de vue du Bactériophage une espèce homogène : un Bactériophage actif contre une souche de ce bacille l'est également contre toutes les autres. Un Bactériophage très virulent pour une souche aux dépens de laquelle il a effectué un certain nombre de passages, peut l'être moins pour une nouvelle souche, mais après quatre ou cinq passages aux dépens de cette dernière il a acquis pour elle une virulence égale à celle qu'il possédait pour la première.

Nous avons vu que les bacilles dysentériques de SHIGA résistants à l'action du Bactériophage sont extrêmement toxiques, doués d'une grande vitalité, inagglutinables par un sérum spécifique et font fermenter le maltose (1).

BACILLE DYSENTÉRIQUE TYPE HISS. — Le Bactériophage doué de propriété anti se trouve fréquemment dans l'intestin normal. La virulence d'une souche de Bactériophage active contre une bactérie quelconque du groupe coli-typhique-dysentérique, s'accompagne fréquemment d'une virulence plus ou moins élevée pour le bacille de HISS

Le bacille dysentérique de HISS constitue une espèce homogène vis-à-vis du Bactériophage.

Les cultures secondaires réensemencées en bouillon sucré tournesolé ne font pas fermenter les sucres de la même manière que les bacilles normaux : sont acides après dix jours les bouillons renfermant glucose, mannite et maltose ; restent alcalins ceux qui contiennent lactose, lévulose et saccharose, il en est de même pour la glycérine. Après un mois, restent alcalins les bouillons renfermant lactose, saccharose et lévulose. Les cultures secondaires et les cultures mixtes donnent la réaction de l'indol, ne touchent ni le rouge neutre ni l'acétate de plomb. Les bacilles résistants sont inagglutinables et doués d'une grande vitalité, de plus ils sont virulents pour l'homme : nous aurons à étudier dans la seconde partie de cet ouvrage un cas de septicémie à Bacille de HISS résistant à l'action du Bactériophage.

(1) POTTEVIN a montré que le bacille de SHIGA normal exerce une action fermentative nette, quoique très faible, sur le maltose ; le bacille résistant exerce cette action d'une manière beaucoup plus énergique.

BACILLE DYSENTÉRIQUE TYPE FLEXNER. — Le Bactériophage anti se trouve aussi fréquemment dans l'intestin normal des vertébrés que les souches précédentes de Bactériophage (1). Toutes les souches isolées, actives vis-à-vis du bacille de FLEXNER l'étaient également pour *B. coli*; quelques-unes étaient dépourvues d'activité pour les autres variétés du bacille dysentérique

Le bacille dysentérique de FLEXNER constitue une espèce homogène vis-à-vis du Bactériophage.

Les bacilles résistants font fermenter glucose, lévulose, maltose et mannite ; ils ne touchent pas le lactose, donnent de l'indol, ne noircissent pas la gélose à l'acétate de plomb et ne virent pas les milieux au rouge neutre ; ils sont inagglutinables par un sérum spécifique et doués d'une grande vitalité

Il est certain que les caractères atypiques de certaines souches du bacille dysentérique au sortir de l'organisme sont liés à la résistance au Bactériophage. Nous en verrons d'ailleurs un cas typique

Cette observation ne s'applique pas seulement aux bacilles dysentériques, elle offre un caractère général.

BACILLE DYSENTÉRIQUE X. — Au cours des recherches j'ai examiné un très grand nombre de déjections provenant de patients atteints de troubles intestinaux ; j'ai isolé dans de nombreux cas de gastro-entérite de l'adulte et du nourrisson un bacille présentant les caractères suivants :

Ensemencé sur gélose tournesolée sucrée, ne fait fermenter aucun sucre (lactose, glucose, lévulose, saccharose, maltose, mannite, galactose), en milieu de BARSIEKOW lactosé et maltosé, pas de virage ; glucosé et mannité, virage au rouge Il est agglutiné par le sérum de convalescent (1/100 à 1/1.500), n'est pas agglutiné par les sérums anti-SHIGA et anti-FLEXNER ; est agglutiné au 1/200 par un sérum agglutinant le bacille de HISS au 1/2.500 Bacille immobile, présentant l'aspect des autres bacilles dysentériques, ne prenant pas le GRAM; toxique pour le lapin.

J'ai isolé de nombreuses souches du Bactériophage actives vis-à-vis de ce bacille : ce Bactériophage anti est constant dans l'intestin des convalescents ayant présenté le bacille dysentérique X dans leurs déjections au cours de la maladie ; je l'ai isolé à diverses reprises de l'intestin d'individus sains, hommes ou animaux. Le bacille X cons-

(1) La présence du Bactériophage [illegible] dans les états pathologiques n'est pas envisagée ici . elle sera traitée [illegible] seconde partie de cet ouvrage.

titue une espèce homogène vis-à-vis du Bactériophage. Certain souches du Bactériophage actives pour le bacille dysentérique étaient également actives vis-à-vis des autres espèces de bacill dysentériques, d'autres seulement vis-à-vis de l'une ou de de d'entre elles ; entretenues pendant plusieurs générations aux dépe du bacille X, elles ont presqu'entièrement perdu leur activité po les autres dysentériques.

Bacille coli — Le Bactériophage anti est extrêmement fréque dans les déjections des vertébrés et invertébrés normaux, mais r s'y trouve qu'exceptionnellement doué d'une grande virulence ; pa contre au déclin des états pathologiques les plus variés on en iso des souches très actives. *B. coli*, surtout récemment isolé, constitu une espèce hétérogène vis-à-vis du Bactériophage : en présen d'un Bactériophage doué d'une très grande virulence pour certa nes souches de *coli*, d'autres souches sont à peine touchées, certa nes même sont complètement réfractaires. *B. coli*, à sa sortie c l'organisme, présente toujours un certain degré de résistance : forme dans l'intestin une culture mixte avec le Bactériophage ; résistance diminue très lentement par passages successifs sur le milieux de culture

Les colonies sur gélose de *B. coli* au maximum de résistance, com plètement réfractaire, présentent un aspect très spécial : ce sont d grosses colonies blanches, coulantes, absolument semblables à de colonies de Friedlander.

Bacille typhique. — On trouve assez fréquemment dans l'intes tin normal des souches très peu actives du Bactériophage anti typhique, il est exceptionnel d'en isoler de très actives : on ne trouv ces dernières que chez le convalescent

Il existe une grande variation dans la virulence d'une même sou che de Bactériophage vis-à-vis des diverses souches du bacille typhi que, surtout récemment isolées. Les bacilles résistants sont inagglu tinables et doués d'une grande virulence pour les animaux d laboratoire.

Bacille paratyphique A. — Le Bactériophage anti est assez fré quent dans les déjections normales. La résistance à l'action du Bac tériophage des diverses souches de ce bacille est bien moins variabl que pour le bacille typhique : le paratyphique A est moins apte à acquérir la résistance. Les bacilles résistants sont inagglutinables e présentent une virulence exaltée.

CILLE PARATYPHIQUE B. — Le Bactériophage anti est très fré-t dans les selles normales. En ce qui concerne la résistance au ériophage le paratyphique B se place entre le bacille typhique paratyphique A. Les bactéries résistantes sont inagglutinables ès virulentes.

LMONELLA (HOG CHOLÉRA). — Le Bactériophage anti a été isolé fois des déjections d'un homme normal, il était doué, au sortir organisme, d'une activité moyenne

ACILLUS TYPHI MURIUM. — Les souches anti-para B du Bactério-ge sont parfois douées d'une certaine virulence pour ce bacille. isolé des souches très actives de l'intestin de rats blancs et gris stant à la maladie expérimentale causée par l'ingestion de cultu-du bacille. Les bacilles résistants sont très virulents et pour-nt être utilisés pour la destruction des rats gris qui résistent s une forte proportion à l'action du virus ordinaire : toutefois la tamination de l'homme serait à craindre du fait même de cette ılence exaltée.

'ai constaté la présence, très passagère d'ailleurs, du Bactério-ge virulent dans le sang de divers rats blancs contaminés au oratoire et qui résistaient à l'infection.

BACILLUS PROTEUS. — J'ai isolé deux souches de Bactériophage ı très actives des selles de deux nourrissons atteints de gastro-érite J'ai essayé l'activité de ces deux souches vis-à-vis de douze antillons de *Proteus* d'origine variée : trois seulement de ces antillons étaient touchés par ces Bactériophages, les mêmes ıs les deux cas, les neuf autres étaient absolument insensibles, ait particulièrement le cas pour deux souches de *Proteus* X_{19}.

_e lysat obtenu en faisant agir le Bactériophage anti sur une ulsion de *Proteus* est, immédiatement après la lyse, extrêmement ique pour le lapin qui est tué en quelques heures par l'injection un demi centimètre cube sous la peau; après une dizaine de rs le lysat a perdu sa toxicité.

BACILLUS GALLINARUM, KLEIN. — (Syn B. sanguinarum, MOORE), Bacilles paragallinarum Je renvoie pour les caractères de ces ers bacilles au chapitre consacré à l'étude de la typhose aviaire. rappellerai simplement ici les curieuses propriétés de *B. gallina-*

rum : à l'exception de l'action pathogène pour l'homme, il présente toutes les caractéristiques du bacille typhique y compris celle de s'agglutiner, au taux limite, sous l'influence d'un sérum anti-typhique ; nous verrons de plus qu'il existe diverses espèces de paragallinarum, au moins trois.

Le Bactériophage actif pour *B. gallinarum* ne l'est pas pour toutes les espèces de paragallinarum, et inversement. *B. gallinarum* est une espèce très homogène vis-à-vis du Bactériophage.

Le Bactériophage anti-gallinarum est constant dans l'intestin des poules qui résistent à la contagion ; je l'ai isolé du sang de trois poules malades qui ont guéri. En dehors des foyers épizootiques on ne le trouve pas dans l'intestin des animaux sains.

Bacille diphtérique. — J'ai isolé deux souches du Bactériophage, actives uniquement vis-à-vis des souches atoxiques du bacille diphtérique, des déjections de deux chevaux immunisés par l'injection de *cultures* de bacilles diphtériques Je signale simplement le fait, les circonstances m'ayant empêché de poursuivre l'étude de ces souches de Bactériophage, étude qui présenterait certainement un très grand intérêt.

Staphylocoque — Un Bactériophage actif vis-à-vis d'un staphylocoque a été isolé dans les conditions suivantes : un cobaye me mord à l'index gauche, le lendemain inflammation qui persiste pendant trois jours ; le quatrième jour, collection de pus dont je prélève une dizaine de gouttes ; ce pus ensemencé largement sur gélose donne une colonie de Staphylocoque blanc et six de Staphylocoque doré. Le reste du pus est mélangé à 20 cm^3 de bouillon et placé à l'étuve pendant 24 h., puis filtré sur terre d'infusoires et sur bougie Après cinq passages aux dépens du staphylocoque blanc, j'obtiens la lyse d'une émulsion. Le Bactériophage isolé ne possédait aucune action, *in vitro*, sur le staphylocoque doré.

Bactérie du barbone. — J'ai isolé une trentaine de souches de Bactériophage anti, dont une douzaine extrêmement actives. L'activité était assez semblable vis-à-vis de diverses souches de la bactérie, dont une provenait d'Italie, les autres d'Indo-Chine. Nous reviendrons longuement sur ce Bactériophage dans le chapitre relatif au barbone.

Au sortir de l'organisme toutes les souches isolées présentaient

une virulence moyenne ou faible vis-à-vis des diverses bactéries intestinales, après une dizaine de passages aux dépens de la bactérie du barbone, ces virulences accessoires étaient fortement atténuées.

Bacille pesteux. — J'ai isolé douze souches de Bactériophage virulentes pour le bacille pesteux, onze provenaient d'excréments de rats récoltés dans divers villages de l'Indo-Chine où sévissait la peste, la dernière des déjections d'un convalescent de peste, le seul d'ailleurs que j'aie pu suivre. Essayées sur quatre souches différentes de bacilles pesteux, l'action s'est montrée semblable sur ces quatre souches, deux provenant d'Indo-Chine, deux de France (Marseille 1919 et Paris 1920).

Bacille de la flacherie, ou, tout au moins, bacille isolé de cadavres de vers à soie morts dans des élevages, en Indo-Chine, d'une maladie présentant les caractères de la flacherie Le Bactériophage anti est fréquent dans l'intestin des vers sains se trouvant dans les élevages contaminés. L'activité de ce Bactériophage a été égale vis-à-vis de trois échantillons de ce bacille, isolés dans trois élevages différents.

Bacillus subtilis — J'ai isolé une souche de Bactériophage active vis-à-vis de ce bacille des déjections d'un patient atteint de dysenterie. N'ayant que très rarement recherché la virulence du Bactériophage vis-à-vis de *B. subtilis* je ne puis dire si cette virulence est fréquente ou exceptionnelle.

Vibrion cholérique. — Sur une centaine de cas de choléra étudiés en Indo-Chine, je n'ai eu l'occasion d'observer qu'un seul cas suivi de guérison. Dans ce dernier, malgré que les examens aient été journaliers, un seul échantillon des selles, au début de la convalescence, m'a montré la présence d'un Bactériophage actif pour le Vibrion (une cinquantaine de plages sur l'étalement sur gélose) : malgré de nombreuses tentatives je n'ai pas réussi à le cultiver en série. Dans aucun des cas mortels je n'ai pu le déceler.

La diversité des espèces bactériennes contre lesquelles j'ai jusqu'à présent isolé des souches virulentes du Bactériophage permet d'émettre l'hypothèse que l'action du Bactériophage est susceptible de se manifester vis-à-vis de n'importe quelle espèce bactérienne.

CHAPITRE IV

L'ULTRAMICROBE BACTÉRIOPHAGE

Morphologie. Vitalité Action des divers agents Unicité du Bactériophage. Les lysines du Bactériophage. Pouvoir opsonique des lysines Sur la nature du Bactériophage.

MORPHOLOGIE

L'ultramicrobe bactériophage est d'une ténuité extrême : à l'ultramicroscope on n'aperçoit, dans les milieux qui le renferment, que des points brillants très fins ; il est vraisemblable que chacun de ces points représente un ultramicrobe, d'autant plus que l'abondance plus ou moins grande de ceux-ci semble correspondre avec le résultat des numérations effectuées sur gélose. Sa ténuité est telle qu'un milieu qui contient plusieurs milliards d'ultramicrobes bactériophages par centimètre cube paraît parfaitement limpide. L'ultramicrobe est pourtant doué d'une masse puisque chaque élément se dépose sur la gélose en des points définis et cette masse est appréciable car les ultramicrobes se sédimentent avec le temps.

Exp — Un tube renfermant une culture de Bactériophage antidysentérique, filtrée sur bougie, est laissé immobile dans une armoire pendant onze mois. Au bout de ce temps je prélève un échantillon de liquide près de la surface et un autre échantillon dans le fond du tube, en appuyant le bout de la pipette sur le verre

Numération des germes à la surface . 280 millions par cm^3.
Numération des germes dans le fond : 2.900 millions par cm^3.

Les ultramicrobes se sédimentent, quoique partiellement, par centrifugation à grande vitesse.

Exp. — 25 cm³ de culture du Bactériophage (anti-dysentérique) filtrée sur bougie, sont centrifugés dans un appareil de Jouan donnant 12 000 tours à la minute, pendant 30 minutes

Résultat des numérations ·

Avant centrifugation . 1 750 millions par cm³.

Après centrifugation surface, 50 millions par cm³.

Après centrifugation fond, 3 700 millions par cm³

La dialyse à travers des membranes de collodion de diverse dureté peut nous fournir un renseignement, bien grossier il est vrai, sur la grosseur d'un ultramicrobe bactériophage. Comme test j'ai mélangé une partie de sérum de cheval, à trois parties de culture du Bactériophage. J'ai dialysé contre eau distillée et recherché après 12 h de dialyse le Bactériophage et l'albumine dans l'eau baignant le sac. J'ai observé qu'on obtenait le passage des ultramicrobes quand il y avait passage de l'albumine, jamais quand la dureté de la membrane était suffisante pour empêcher le passage de celle-ci. L'ultramicrobe bactériophage passe donc où passe une molécule d'albumine du sérum, il est retenu quand cette molécule est retenue Il appartiendra aux physiciens d'en déterminer la dimension exacte par des méthodes plus rigoureuses, cette détermination serait d'autant plus intéressante que le Bactériophage est le seul ultramicrobe sur lequel elle soit actuellement possible, puisque c'est le seul dont on puisse compter les éléments; elle pourrait servir à élucider un problème important touchant la constitution de la matière organisée.

On a calculé qu'un ultramicrobe de 1/100 de μ de diamètre devait contenir une vingtaine de molécules d'albumine et cinq à six atomes de soufre. Les physiciens ont déterminé la grosseur des pores des membranes de collodion les plus serrées : ils n'ont pas plus de deux millionièmes de millimètre; or, l'ultramicrobe de la peste aviaire traverse de telles membranes, chaque élément ne pourrait avoir plus de 1/5.000 de μ de diamètre; il serait donc composé de un dixième de molécule d'albumine. D'un autre côté, un ultramicrobe est déjà un organisme fort complexe, susceptible d'adaptation, possédant la faculté de sécréter des toxines, des diastases, ayant en un mot toutes les caractéristiques des êtres vivants, ce qui implique une organisation déjà très élevée. Nous nous trouvons donc acculé à une absurdité, car on ne peut concevoir un organisme complexe formé d'une seule molécule ou de la dixième partie d'une et il serait plus simple d'avouer qu'on ne peut se figurer sous quel aspect se présente la vie chez l'ultramicrobe et sous quelle forme

y existe la matière. Ce n'est que depuis la découverte du Bactériophage qu'on peut affirmer que chaque ultramicrobe est une masse matérielle susceptible de multiplication sous forme de masses semblables; c'est grâce à lui que la notion de l'ultramicrobe a acquis une certaine précision. L'étude de l'ultramicrobe bactériophage par les physiciens apportera des données extrêmement intéressantes, car c'est le seul ultramicrobe dont l'existence matérielle soit démontrée par l'expérience et c'est le seul dont il soit possible actuellement de fixer les dimensions, grâce à la possibilité de connaître le nombre d'éléments contenus dans un liquide.

VITALITÉ

L'ultramicrobe bactériophage est extrêmement résistant vis-à-vis de la plupart des agents de destruction, propriété qu'il partage d'ailleurs avec d'autres ultramicrobes.

Sa vitalité est très grande : les filtrats ou les cultures qui le contiennent sont encore actifs après six ans de conservation en tube scellé. Tous les germes renfermés dans une culture ne présentent d'ailleurs pas la même résistance car, après quatre années de conservation, une culture qui renfermait au début deux milliards d'ultramicrobes par centimètre cube n'en contient plus qu'une centaine de millions vivants. Cette vitalité n'est pas exceptionnelle : certaines bactéries, non sporulées, offrent une vitalité du même ordre; les cultures de *B. coli*, par exemple, sont encore repiquables après une dizaine d'années, et, là aussi, les divers bacilles d'une culture n'offrent pas la même résistance, car le nombre de ceux qui survivent devient de plus en plus faible avec le temps.

Si on laisse s'évaporer lentement à la température ordinaire une culture de Bactériophage, on retrouve celui-ci vivant dans les quelques gouttes de liquide sirupeux qui restent au fond du tube; certaines bactéries se comportent d'ailleurs de même. Par contre on ne le retrouve plus vivant après douze mois dans une culture en bouillon glucosé, alors qu'il est encore vivant dans un bouillon lactosé.

Dans les déjections conservées à la température ordinaire en tubes scellés pendant 34 mois (septembre 1915 à juillet 1918), on retrouve

le Bactériophage vivant et aussi actif qu'au début, l'expérience a été réalisée sur 4 échantillons de déjections provenant de convalescents de dysenterie

Il résiste très longtemps à l'état sec un fragment de papier filtre stérilisé est imbibé avec une goutte de culture de Bactériophage (anti-dysentérique) le papier est séché dans le vide et conservé en tube scellé pendant six mois à la température ordinaire ; après ce temps le fragment de papier est introduit dans une émulsion de bacilles dysentériques ; on obtient une lyse normale, quoique retardée : les ultramicrobes ont donc survécu Un autre ultramicrobe, celui de la mosaïque du tabac, jouit de la même propriété, il résiste pendant deux ans dans les feuilles desséchées. Il est même inutile d'aller chercher des exemples de microbes aussi résistants chez les ultramicrobes : le Coccobacille des sauterelles est un bacille non sporulé, or, dans des cadavres de sauterelles mortes de la maladie qu'il provoque chez ces insectes (cadavres desséchés dans le vide sulfurique, pulvérisés et conservés en tubes scellés pendant trois ans), j'ai constaté que le Coccobacille se conserve vivant et virulent, car cette poudre ensemencée dans du bouillon donne des cultures normales et virulentes pour la sauterelle

ACTION DES DIVERS AGENTS

Agents physiques. — Vis-à-vis de la température, l'ultramicrobe bactériophage présente une résistance moyenne · il est tué par un séjour de 30 minutes à la température de 65° C Cette température n'a rien d'excessif : certaines bactéries peuvent même se cultiver à une température de 75° C et Duclaux a montré que les cellules jeunes de *Tyrothrix tenuis* ne périssaient que vers 100° C.

L'ultramicrobe attaque les bactéries et se développe à leurs dépens en présence ou en l'absence d'oxygène, ainsi que dans une atmosphère d'azote ou d'hydrogène

Agents chimiques. — L'action des antiseptiques est intéressante à étudier, car ces substances n'agissent pas de la même manière sur certains ultramicrobes que sur les bactéries ordinaires : très sensibles vis-à-vis de l'action de certains antiseptiques, ils se montrent très résistants vis-à-vis de certains autres.

Une culture de Bactériophage (anti-dysentérique) en eau physiologique (1) est répartie dans quatre tubes : un, reste comme témoin, le second est additionné de 1/200 de bichlorure de mercure, le troisième de 1/100 de sulfate de cuivre, le quatrième de 1/100 d'acide phénique Après trois jours de contact le Bactériophage est encore vivant dans tous les tubes. Après quatre jours il est tué dans les tubes additionnés de bichlorure de mercure et de sulfate de cuivre. Après sept jours dans le tube qui a reçu l'acide phénique. Il reste naturellement vivant dans le tube témoin.

Il n'est pas tué par un séjour d'une semaine dans un liquide saturé d'essence de thym ou de girofle, mais son action lytique ne peut s'y manifester. Il en est de même dans les milieux contenant du chloroforme ou du fluorure de sodium (BABLET)

ELIAVA et POZERSKI ont déterminé avec précision les limites mortelles, en 24 h., des concentrations en H et OH libres : la zone compatible avec la vie est comprise entre 2,5 P_H et 8,54 P_H, ce qui correspond environ à un acide 1/160 N et à une base 1/260 N, quel que soit l'acide ou l'alcali essayé

Il est difficile d'établir une comparaison avec les limites de résistance des autres microbes, l'ultramicrobe bactériophage étant encore le seul pour lequel semblable détermination ait été faite (2).

L'action de la glycérine est extrêmement intéressante. Le Bactériophage reste vivant pendant au moins deux ans dans un liquide composé par parties égales de glycérine et de bouillon ou d'eau physiologique. Une émulsion de bactéries dans un tel milieu, milieu

(1) Le bouillon ne convient pas à cause des précipités qui se forment lors de l'addition de certains antiseptiques, ce qui peut fausser totalement les résultats.

(2) Je citerai à titre d'exemple les données suivantes qui se rapportent, non pas à la zone de vie, mais à la zone de croissance.

G DERNBY (*Ann. Institut Pasteur*, avril 1921, p 277) donne les chiffres suivants

Staphylocoque.	4,8-8,1 P_H
B subtilis .	4,5-8,5 P_H
B proteus .	4,4-8,4 P_H
B coli	4,4-7,8 P_H

L'ultramicrobe bactériophage est donc extrêmement sensible à l'action des bases et des acides puisque sa limite mortelle d'alcalinité est la même que la limite de croissance des bactéries ordinaires, sa limite mortelle d'acidité n'en est pas très éloignée ; il est donc plus sensible que les bactéries aux concentrations en ions libres H et OH Autre preuve qu'il s'agit d'un être vivant.

dans lequel ces bactéries ne peuvent se reproduire, est lysée d'une manière aussi parfaite qu'en bouillon ordinaire ; pourtant la glycérine à plus forte concentration détruit l'ultramicrobe bactériophage. BABLET a en effet montré qu'il est tué par le contact prolongé pendant six jours de un demi-centimètre cube de culture du Bactériophage dans 9 cm³ 1/2 de glycérine. C'est le cas de rappeler que la glycérine constitue le meilleur liquide de conservation pour les toxines et les diastases. Les autres ultramicrobes connus résistent en général à l'action de la glycérine

Nous venons de voir qu'une émulsion en milieu glycériné était lysée par le Bactériophage, comme toujours la culture lysée est devenue une culture de Bactériophage. Si nous laissons s'évaporer très lentement une telle culture à la température ordinaire nous aurons finalement un culot composé de glycérine, toute l'eau se sera évaporée ; dans de telles conditions le Bactériophage reste vivant dans ce culot de glycérine . il s'est accoutumé, tandis qu'il est tué si on le transporte directement d'une culture en bouillon dans de la glycérine concentrée On connaît de nombreux faits d'accoutumance de microbes aux antiseptiques : l'accoutumance est l'apanage exclusif des êtres vivants.

ELIAVA et POZERSKI ont montré que les sels de quinine neutres étaient antiseptiques pour l'ultramicrobe bactériophage qui est tué en 30 minutes dans une solution à 3 o/o, en quelques heures dans une solution à 1 o/o. Le chlorhydrate d'émétine et la saponine aux mêmes concentrations restent sans action. Cette action antiseptique de la quinine est assez singulière vis-à-vis d'un germe par ailleurs aussi résistant à l'action des antiseptiques On ne peut en déduire que le Bactériophage soit un protozoaire car la quinine jouit de propriétés antiseptiques vis-à-vis de plusieurs espèces bactériennes ; par contre elle n'a aucune action sur les diastases et les toxines.

Si l'on traite une culture par l'acétone on obtient un précipité formé par les matières albuminoïdes du bouillon qui entraîne les germes bactériophages, dont la plupart sont d'ailleurs détruits. L'ultramicrobe bactériophage se comporte en cela comme les bactéries sporulées qu'on retrouve vivantes dans le précipité. Je signalerai à ce propos une assez curieuse observation : on considère ordinairement l'acétone comme un liquide stérile, il n'en est rien car j'ai constaté que des nombreux flacons d'acétone étaient contaminés par *B. subtilis*.

L'alcool donne le même précipité, mais l'ultramicrobe bactério-

phage, contrairement à ce qui se passe pour l'ultramicrobe de la mosaïque du tabac, est tué en moins de 48 h. dans l'alcool à 90°. Ce précipité, comme nous le verrons, renferme les produits de sécrétion du Bactériophage.

UNICITÉ DU BACTÉRIOPHAGE

J'ai exposé en détail au cours des chapitres précédents diverses expériences qui montrent que, quelle que soit la bactérie attaquée, l'ultramicrobe qui attaque appartient toujours à la même espèce; nous en retrouverons d'autres dans un instant. Je me bornerai donc ici à grouper ces expériences :

1° Une même souche du Bactériophage attaque généralement plusieurs espèces bactériennes à la fois.

2° Une souche du Bactériophage, entretenue au cours d'un millier de passages *in vitro*, toujours aux dépens d'une même bactérie, le bacille dysentérique de Shiga, attaque le bacille typhique et *B. coli*.

Nous avons vu également qu'un Bactériophage actif pour le Staphylocoque et entretenu pendant plus de cent passages consécutifs aux dépens du Staphylocoque, possède encore la virulence pour le bacille dysentérique. Ces deux espèces bactériennes sont tellement éloignées que l'action croisée constitue un argument irréfutable en faveur de l'unicité du Bactériophage.

3° Le sérum antibactériophage, dont nous allons passer en revue dans un instant les propriétés, contient une sensibilisatrice spécifique pour le Bactériophage, comme le montre la réaction de fixation du complément de Bordet-Gengou et cette sensibilisatrice est la même pour toutes les souches de Bactériophage : un Bactériophage antidysentérique, un Bactériophage anti-pesteux provenant de l'homme, un Bactériophage anti-pesteux provenant du rat, un Bactériophage anti-barbone provenant du buffle, fixent tous l'alexine en présence d'un sérum de lapin traité par des injections répétées de cultures du Bactériophage anti-dysentérique. J'ai choisi à dessein pour cette expérience des souches du Bactériophage n'ayant aucune action croisée *in vitro* vis-à-vis des différentes bactéries attaquées. La réaction de fixation du complètement est spécifique, quant à la diagnose des espèces.

Les preuves de l'unicité du Bactériophage sont donc multiples : il n'existe qu'un seul Bactériophage, commun à l'homme et aux animaux, susceptible par accoutumance d'acquérir la virulence vis-à-vis de toutes les espèces bactériennes.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'ultramicrobe bactériophage ne se cultive dans aucun milieu artificiel, c'est un parasite obligé qui ne peut se reproduire que dans des cellules vivantes C'est d'ailleurs le cas pour tous les ultramicrobes connus, car le seul qui fasse exception, l'*Astérococcus* de la péripneumonie, ne peut plus être considéré comme un ultramicrobe depuis qu'on a reconnu qu'il était parfaitement visible sur préparations colorées : c'est une bactérie de petite taille. Tous les ultramicrobes paraissent être des parasites intracellulaires car les lésions qu'ils produisent sont, pour tous, caractérisées par des inclusions protoplasmiques ou des altérations des noyaux cellulaires. L'ultramicrobe bactériophage ne différerait des autres ultramicrobes connus que par son action élective sur les êtres unicellulaires, les autres sur les organismes pluricellulaires.

Il aurait été d'ailleurs bien étrange que de toutes les cellules vivantes, les bactéries aient été les seules à jouir du privilège de l'immunité absolue, alors que, même avant la découverte du Bactériophage, on connaissait déjà des ultramicrobes assez petits pour les parasiter : certains sont, en diamètre, deux mille fois plus petits qu'une bactérie de grosseur moyenne, soit près de deux milliards de fois en volume Un de ces ultramicrobes est à une bactérie, ce que la bactérie est à une grosse mouche.

LES LYSINES DU BACTÉRIOPHAGE (1)

Il est évident que l'ultramicrobe bactériophage ne peut dissoudre les bactéries par sa seule présence : il ne peut exercer cette action qu'au moyen de diastases lytiques.

Dans une culture du Bactériophage, les lysines qui lui ont servi à dissoudre les bactéries doivent rester en solution une fois la lyse

(1) Les expériences relatives aux lysines ont été exécutées avec la collaboration de G. Eliava.

terminée; d'un autre côté, l'ultramicrobe ne résiste pas au traitement par l'alcool Il nous suffit donc, pour obtenir les lysines, de faire subir à la culture du Bactériophage le traitement classique de séparation des diastases.

Mélangeons un volume de culture du Bactériophage anti-dysentérique avec neuf volumes d'alcool à 96°. Après 48 heures de contact, le précipité qui s'est formé s'étant bien rassemblé, décantons le liquide surnageant. Le précipité, qui renferme les lysines mélangées avec toutes les substances du milieu précipitables par l'alcool, est presqu'entièrement soluble dans l'eau salée (1)

Exp. Faisons un mélange par parties égales de bouillon et d'une solution du précipité alcoolique, obtenue en dissolvant ce précipité dans une quantité d'eau salée à 8 pour 1.000 égale au volume de la culture du Bactériophage mise en œuvre. Ajoutons dans ce milieu une quantité de bacilles dysentériques suffisante pour donner un louche faible D'autre part faisons un témoin renfermant une quantité égale de bacilles dans un milieu composé de moitié bouillon, moitié eau salée. Plaçons à l'étuve à 37°.

Après 24 heures : le témoin est très trouble; le bouillon renfermant la lysine est légèrement louche. L'étalement sur gélose donne dans les deux cas une nappe bacillaire normale.

Après 48 heures le témoin présente le même aspect et l'étalement sur gélose donne une culture en nappe. La culture renfermant la lysine est légèrement louche et les étalements sur gélose ne donnent que des colonies isolées. Un comptage montre qu'il y a vingt-deux fois moins de bacilles vivants dans cette dernière culture que dans la culture témoin.

Après 3 jours l'aspect est le même qu'après 48 heures.

Après 4 jours les bactéries commencent à acquérir la résistance à l'action de la lysine, le milieu se trouble et les étalements sur gélose donnent de nouveau une culture en nappe.

A aucun moment on n'obtient sur la gélose les plages caractéristiques de la présence des ultramicrobes bactériophages et l'action ne se continue pas en série.

Le précipité par l'alcool renferme donc une diastase lytique libre l'ultramicrobes vivants. L'action dissolvante, quoique nette, est faible; par contre, comme nous allons le voir, la lysine se manifeste par une action opsonique extrêmement puissante.

(1) Les opérations doivent être faites aseptiquement car la filtration de a solution sur bougie affaiblit considérablement son activité.

POUVOIR OPSONIQUE DES LYSINES

Dans les expériences suivantes le pouvoir opsonique a été recherché par la méthode de Wright et Douglas : on fait un mélange composé de un tiers du liquide dont on recherche le pouvoir opsonique, un tiers d'une émulsion de leucocytes et un tiers d'une émulsion de la bactérie vis-à-vis de laquelle on recherche ce pouvoir. Le mélange est aspiré dans l'effilure d'une pipette qui est scellée et placée pendant un quart d'heure dans un bain-marie à 38°; le mélange est ensuite étalé sur lame, coloré et examiné.

Nous avons pris comme réactifs : des leucocytes de cobaye, une culture de Bactériophage anti-Shiga et une émulsion de bacilles dysentériques de Shiga.

Exp — 1. Témoin leucocytes, bacilles, bouillon ordinaire.
100 leucocytes ont phagocyté 36 bactéries indice opsonique = 1
2 Leucocytes, bacilles, culture du Bactériophage âgée de 2 ans.
100 leucocytes ont phagocyté 692 bactéries : indice = 19,2
3 Même culture du Bactériophage diluée au 1/250.
100 leucocytes ont phagocyté 156 bactéries . indice = 4,3.
4 Leucocytes, bacilles, culture du Bactériophage âgée de 6 jours.
100 leucocytes ont phagocyté 1510 bactéries . indice = 41,9
5 Même culture du Bactériophage diluée au 1/250
100 leucocytes ont phagocyté 146 bactéries . indice = 4,1.
6 Même culture du Bactériophage, mais chauffée pendant 30 minutes à 60°.
100 leucocytes ont phagocyté 728 bactéries : indice = 20,2.
7 Même culture du Bactériophage chauffée, diluée au 1/250.
100 leucocytes ont phagocyté 101 bactéries indice = 2,7

Dans les expériences 2, 4, 6, l'indice indique représente un minimum : un grand nombre de leucocytes contenaient un tel nombre de bacilles phagocytés que la numération était impossible; nous n'avons effectué les numérations que sur les seuls leucocytes ne renfermant pas d'amas; l'indice est donc en réalité encore plus élevé (1).

L'action opsonique de la culture du Bactériophage se manifeste avec une telle rapidité qu'il est bien improbable que le pouvoir opsonique soit exercé directement par les ultramicrobes : nous avons vu

(1) Je rappellerai que les indices opsoniques des sérums sont de beaucoup inférieurs à ceux qu'on obtient avec les cultures du Bactériophage : un indice de 2 est déjà exceptionnel.

en effet, que les bactéries ne sont parasitées qu'après un temps appréciable, de 10 à 20 minutes.

Exp — On met en contact 1/3 d'émulsion de leucocytes, 1/3 d'émulsion de bacilles de Shiga, 1/3 de culture du Bactériophage anti-Shiga. On prélève une goutte du mélange

de suite 100 leucocytes ont phagocyté 197 bactéries, indice = 5,4,
après 2'30" 100 leucocytes ont phagocyté 362 bactéries, indice = 10;
après 5' · 100 leucocytes ont phagocyté 372 bactéries, indice = 10,3,
après 7'30" 100 leucocytes ont phagocyté 440 bactéries, indice = 12,2;
après 10' 100 leucocytes ont phagocyté 824 bactéries, indice = 23.

Après 10' certains leucocytes sont tellement remplis que le comptage est mpossible le chiffre donné est un minimum basé sur des numérations faies sur les leucocytes ne renfermant pas d'amas de bactéries

Le pouvoir opsonique doit être exercé, non pas par les ultrami-robes, mais par la lysine contenue dans la culture. En voici la preuve.

Exp — Deux mgr du précipité alcoolique, dont nous avons parlé plus haut, encore humide, sont dissous dans 10 cm³ d'eau salée à 8 p. 1 000 On mélange 1/3 de cette solution avec 1/3 d'une émulsion de bacilles de Shiga et /3 de l'émulsion de leucocytes Après 15' à 38°, l'examen microscopique sur préparation colorée montre que 100 leucocytes ont phagocyté 536 bactéries; ertains leucocytes contiennent des amas incomptables, ce chiffre est donc un minimum. Indice = 14,9.

Le pouvoir opsonique des cultures du Bactériophage est donc dû la lysine sécrétée par les ultramicrobes, lysine qui reste dans les ultures une fois les bactéries dissoutes.

L'action sur les bactéries résistant à l'action du Bactériophage st intéressante à vérifier.

Exp. — 1 Mélange de 1/3 d'une émulsion de bacilles de Shiga résistants, /3 d'une culture du Bactériophage anti-Shiga âgée de 2 ans, 1/3 de l'émulsion de leucocytes Après 15' : 100 leucocytes ont phagocyté 8 bactéries : ndice = 0,22, soit 90 fois moins qu'avec des bacilles normaux.

2. Même expérience mais avec une culture du Bactériophage âgée de jours

100 leucocytes ont phagocyté 13 bactéries · indice = 0,38, soit 108 fois moins qu'avec des bacilles normaux.

3 Même expérience mais avec la solution de lysine,

100 leucocytes ont phagocyté 19 bactéries : indice = 0,53, soit 28 fois moins qu'avec des bacilles normaux.

Les bactéries résistantes au Bactériophage résistent donc également à la phagocytose.

Nous avons effectué les mêmes expériences avec une souche de Bactériophage anti-barbone et la bactérie du barbone Les résultats sont semblables.

Exp. A. — 1 Témoin. Mélange 1/3 émulsion leucocytes, 1/3 bouillon, 1/3 émulsion de la bactérie du barbone; après 15′ à 38° · aucune bactérie dans 100 leucocytes,

2. Mélange 1/3 leucocytes, 1/3 émulsion de la bactérie du barbone, 1/3 culture Bactériophage anti-barbone âgée de 8 mois.

100 leucocytes ont phagocyté 109 bactéries.

3 Même expérience mais la culture de Bactériophage diluée au 1/250

100 leucocytes ont phagocyté 52 bactéries

4. Mélange · 1/3 leucocytes, 1/3 émulsion de la bactérie du barbone, 1/3 solution précipité alcoolique d'une culture récente du Bactériophage anti-barbone 2 mgr pour 10 cm³ eau salée.

100 leucocytes ont phagocyté 239 bactéries

Exp B — On mélange 1/3 d'émulsion de leucocytes, 1/3 d'une culture de la bactérie du barbone et 1/3 d'une culture récente (4 jours) du Bactériophage anti-barbone On place à 38° et on prélève une goutte du mélange

de suite : 100 leucocytes ont phagocyté 30 bactéries,
après 2′30″ 100 leucocytes ont phagocyté 139 bactéries,
après 5′ 100 leucocytes ont phagocyté 201 bactéries,
après 7′30″ 100 leucocytes ont phagocyté 271 bactéries,
après 10′ 100 leucocytes ont phagocyté 269 bactéries
Aucune bactérie phagocytée dans un mélange témoin fait avec du bouillon

Ici il est impossible de calculer l'indice opsonique puisqu'il n'y a pas de phagocytose dans le mélange témoin : l'indice est infini.

La bactérie du barbone résistant à l'action du Bactériophage est également résistante à la phagocytose.

Exp. — Mélange 1/3 de l'émulsion de leucocytes, 1/3 de la même culture du Bactériophage anti-barbone que dans l'expérience précédente, 1/3 d'une émulsion de la bactérie du barbone résistant à la lyse Après 15′ à 37° 100 leucocytes ont phagocyté 3 bactéries, c'est-à dire 90 fois moins qu'avec les bactéries normales.

La souche de Bactériophage anti-dysentérique employée pour les expériences décrites précédemment manifestait une certaine action, très faible d'ailleurs, vis-à-vis du bacille typhique, les expériences suivantes montrent qu'elle exerce également une certaine action opsonique vis-à-vis de ce bacille.

Exp — 1 Mélange 1/3 bouillon, 1/3 émulsion leucocytes, 1/3 émulsion bacilles typhiques ; après 15′ à 38°

100 leucocytes ont phagocyté 68 bacilles, indice = 1.

2 Mélange 1/3 culture Bactériophage anti-Shiga, 1/3 émulsion leucocytes, 1/3 émulsion bacilles typhiques

100 leucocytes ont phagocyté 203 bacilles, indice = 3

3 Mélange 1\3 solution lysine (la même que celle qui a été employée pour les recherches relatives au bacille dysentérique), 1/3 émulsion leucocytes, 1/3 émulsion bacilles typhiques

100 leucocytes ont phagocyté 109 bactéries, indice = 1,0

La lysine jouit encore d'une propriété assez singulière : employée dans la réaction de fixation du complément comme anti-corps, elle joue le rôle d'ambocepteur.

Voici une expérience, prise entre plusieurs autres qui ont donné des résultats identiques.

Antigène, préparé suivant la méthode de Maurice NICOLLE : une anse d'une culture sur gélose du bacille dysentérique de SHIGA est émulsionnée dans 4 cm³ d'eau salée ; l'émulsion, portée pendant 5 minutes à 100° puis refroidie, sert d'antigène.

Anticorps : précipité alcoolique d'une culture du Bactériophage anti-SHIGA, remis en solution dans une quantité d'eau salée égale au volume de la culture.

Complément : sérum frais de cobaye titré.

Système hémolytique ordinaire (Globules mouton-sérum anti chauffé)

Tube	Antigène cc	Anticorps cc.	Complément cc	Eau salée cc		Système hémol cc	Résultats
1	0,5	0,2	0,2	1,6	1 heure au bain-marie à 37° C	1	++
2	0,5	0,4	0,2	1,4		1	++
3	0,5	0,5	0,2	1,3		1	+++
4	0,5	0,6	0,2	1,2		1	+++
5	0,5	—	0,2	1,8		1	Hémolyse totale
6	—	0,6	0,2	1,9		1	Hemolyse totale rapide
7	—	—	0,2	2,3		1	Hémolyse totale
8	—	—	—	2,5		1	++++

Par elle-même la lysine ne fixe pas le complément, au contraire, comme le montre le tube 6, elle active plutôt l'hémolyse. C'est donc bien sur l'anticorps touché par la lysine que se fixe le complément.

On ne peut guère tirer de conclusion de cette curieuse expérience :

des recherches ultérieures montreront s'il existe une relation entre la sensibilisatrice de BORDET et la lysine du Bactériophage ou s'il s'agit de deux principes différents agissant d'une manière identique, quant à la fixation du complément.

Toutes ces expériences montrent que les ultramicrobes bactériophages sécrètent un principe, précipitable par l'alcool, résistant à la température de 58° et se conservant plusieurs mois dans les cultures du Bactériophage. Ce principe, outre son action dissolvante, exerce un pouvoir opsonique énergique vis-à-vis des bactéries pour lesquelles les ultramicrobes dont il provient possédaient la virulence. L'action opsonique semble proportionnelle à la virulence du Bactériophage pour la bactérie considérée Les bactéries ayant acquis la résistance vis-à-vis du Bactériophage sont également résistantes à la phagocytose; nous avons vu d'autre part qu'elles jouissent d'une virulence exaltée.

NATURE DU BACTÉRIOPHAGE

Ce paragraphe sera sans doute jugé inutile par le lecteur qui a suivi les expériences fournies jusqu'ici : aucune ne laisse place pour une conception autre que celle d'un ultramicrobe, parasite des bactéries.

Toute controverse au sujet de la nature du principe bactériophage n'est que la reprise d'une vieille discussion qu'on croyait depuis longtemps terminée. Avec les termes nouveaux de diastase susceptible de se multiplier, de coferments ou de catalyseurs jouissant du don métaphysique de l'ubiquité, d'hérédité excrétée transmissible par mouvement communiqué, c'est une remise à neuf de la vieille théorie de STAHL : « tout corps amené à l'état de putréfaction transmet très facilement cet état à un autre corps encore exempt de corruption ». Cette théorie d'une multiplication d'un principe par mouvement communiqué avait été reprise par LIEBIG dans sa fameuse discussion avec PASTEUR touchant le mécanisme de la fermentation. PASTEUR a démontré expérimentalement qu'elle était fausse, qu'une action en série ne pouvait être produite que par un être vivant, et on pouvait croire le fait désormais acquis. J'ai été obligé de reprendre cette discussion, et les expériences destinées à montrer qu'il s'agit bien d'une action vitale dans la bactériolyse transmissible en

série, sont au fond de même nature que les expériences qui ont servi à Pasteur. Phénomène vital ou mouvement communiqué, la discussion et les expériences de démonstration portent sur des faits identiques, nous descendons seulement d'un échelon dans l'ordre de grandeur des êtres en présence. La même discussion se renouvellera peut-être un jour, si l'on descend encore d'un échelon et si l'on découvre, par exemple, un microbe parasite du Bactériophage . l'infiniment petit est aussi concevable que l'infiniment grand, nous n'avons pas le droit de lui assigner une limite.

Chaque fois que nous nous trouvons en présence d'une action en série, cette action ne peut être produite que par un être susceptible de se multiplier.

Comme nous l'avons vu, le Bactériophage présente des propriétés analogues à celles des autres germes vivants connus : sa résistance vis-à-vis des agents de destruction, quoique grande, est pourtant moindre que celle de bien des êtres dont la nature vivante est indiscutable et indiscutée. Circonstance particulière : il est spécialement sensible à l'action de certains antiseptiques qui n'agissent nullement sur les diastases, la quinine par exemple. Quant à la glycérine qui détruit le Bactériophage, elle est, par excellence, le liquide de choix pour la conservation indéfinie des toxines et des diastases les plus fragiles.

Je relève en outre au cours des chapitres précédents les faits suivants qui établissent la nature vivante du Bactériophage.

1° Le Bactériophage se multiplie, puisque les cultures peuvent se continuer indéfiniment en série.

Il existe toujours une certaine proportionnalité dans l'action des diastases : cette action est d'autant plus énergique que la quantité de diastase est plus forte. Avec le Bactériophage, rien de semblable, ce qui agit c'est la qualité du principe lytique et non sa quantité, ce qui est le propre de l'action vitale. Un microbe tue avec sa virulence, un poison par sa masse.

2° Une culture du Bactériophage ne perd rien de son activité si on la filtre sur bougie . il ne peut donc s'agir d'une « hérédité » à la lyse de la part de la bactérie, puisqu'on établit une barrière entre l'ascendant et le descendant.

3° Avec des souches suffisamment actives du Bactériophage on obtient une lyse totale et permanente, toutes les bactéries contenues dans l'émulsion sont définitivement détruites. De plus les passages en série du Bactériophage sont possibles dans des émulsions bacté-

iennes faites dans des liquides qui ne permettent pas le dévelop-pement de ces bactéries : l'eau physiologique ou le bouillon glycé-riné à 40 o/o, par exemple Ceci prouve encore que la survie d'un certain nombre de bactéries ne constitue pas un facteur de l'action en série, car autrement, ce facteur venant à faire défaut, la série ne pourrait se continuer.

4° Le Bactériophage donne sur gélose des colonies aux dépens des bactéries, ce qui permet de compter les éléments actifs Un ferment soluble, diastase ou toxine, ne pourrait concentrer son action sur des points définis. On pourrait objecter que la diastase lytique est fournie par la bactérie elle-même et que chaque plage sur la gélose représente l'endroit où se trouvait, lors de l'étalement, une bactérie particulièrement apte à fournir cette diastase sous l'influence d'une action X.

Les expériences suivantes démontrent que cette objection est sans valeur.

Exp. A. — Nous prenons 10 tubes Dans le premier nous versons 10 cm^3 d'une émulsion de bacilles dysentériques à 100 millions par cm^3, dans le second tube nous versons 10 cm^3 d'une émulsion à 200 millions de bacilles par cm^3, dans le troisième 10 cm^3 d'une émulsion à 300 millions et ainsi de suite, en augmentant de 100 millions le titre de l'émulsion que reçoit chaque tube le dixième tube contient donc une émulsion à 1 000 millions par cm^3. Chacun de ces tubes est ensuite additionné d'une quantité égale et très faible d'une culture du Bactériophage filtrée sur bougie soit 1/200 000 de cm^3. Nous avons donc une série de 10 tubes renfermant une émulsion de plus en plus concentrée de bacilles dysentériques dans la proportion de 1 2 . 3 4 5 . 6 . 7 . 8 . 9 . 10, et quantité égale de culture du Bactériophage. Nous agitons de suite soigneusement les tubes et nous étalons 1/50 de cm^3 de chacune des dix émulsions sur autant de tubes de gélose inclinée Après incubation à 37°, chacun de ces dix tubes de gélose présente une culture de bacilles dysentériques parsemée de plages et le nombre de ces plages est pratiquement égal pour chacun des dix tubes

B — Nous prenons dix tubes contenant chacun 10 cm^3 d une émulsion à 100 millions de bacilles par cm^3, c'est-à-dire une émulsion au même titre dans chacun des tubes Dans le premier tube nous additionnons l'émulsion de un cent millième de cm^3 d'une culture de Bactériophage filtrée, dans le second tube nous introduisons un deux cent millième de cm^3 de la culture du Bactériophage, un trois cent millième dans le troisième tube, un quatre cent millième dans le quatrième et ainsi de suite, chaque tube recevant une dose de plus en plus faible de culture du Bactériophage, le dixième tube en recevant donc un millionième. Nous avons donc une série de dix tubes renfermant tous une quantité égale de bacilles et une quantité de culture du Bactériophage variant suivant une progression de 10 . 9 : 8 : 7 6 · 5 : 4 : 3 · 2 1. Nous

agitons fortement ces tubes et nous étalons de suite 1/50 de cm^3 de chacune des dix émulsions sur autant de tubes de gélose inclinée. Après incubation à 37° nous obtenons dans chacun de ces dix tubes une culture en nappe de bacilles dysentériques parsemée de plages, ces plages sont d'autant plus nombreuses dans chacun des tubes que la proportion de culture du Bactériophage ajoutée à l'émulsion a été plus élevée, pratiquement leur nombre varie du tube 1, qui a reçu la plus grande quantité de Bactériophage, au 10 qui en a reçu le moins, dans la proportion de 10 9 . 8 · 7 . 6 : 5 : 4 3 2 1.

Ces deux expériences, qui se complètent l'une l'autre, démontrent d'une manière indubitable que le principe actif est uniquement contenu dans la culture filtrée du Bactériophage et que ce principe actif est constitué par des éléments matériels, susceptibles de former des colonies sur gélose aux dépens des bactéries environnantes, ce qui nous permet de les dénombrer. Ces éléments matériels sont de plus susceptibles de multiplication comme le démontre et la formation de colonies et l'action en série : ce ne peuvent être que des organismes vivants. Cètte expérience à elle seule suffirait à démontrer que le Bactériophage est un « ferment figuré » ce qui implique la réalité de l'existence de l'ultramicrobe parasite des bactéries.

5° Eliava et Pozerski ont montré que vis-à-vis des concentrations en ions libres H et OH, les limites mortelles pour le Bactériophage sont plus étroites que pour les bactéries. Les diastases et les toxines se comportent d'une toute autre façon

6° Les diastases sont entraînées par les précipités minéraux qui se forment au sein du liquide qui les renferme : le principe Bactériophage n'est pas entraîné.

7° Les diastases en solution dans un liquide sont entraînées par les précipités qui se forment par addition d'alcool : c'est ce qui se produit avec les cultures du Bactériophage, mais l'élément actif qui se précipite n'est pas le Bactériophage lui-même, les ultramicrobes sont détruits par l'alcool et le principe qui se précipite ne peut reproduire l'action en série. Cette possibilité d'extraire de la culture un principe actif qui ne peut être qu'un produit de sécrétion du Bactériophage, montre bien que ce dernier ne peut être qu'un être vivant.

8° J'ai montré que le Bactériophage est susceptible de s'accoutumer à l'action nocive de la glycérine : l'accoutumance est l'apanage exclusif des êtres vivants

9° Il est impossible d'isoler deux souches du Bactériophage qui

identiquement semblables comme intensité d'action et éten-
action et, pour une même souche, on peut faire varier expé-
talement cette intensité : la variation est la caractéristique
ive de la vie.

L'action lytique est toujours exercée par un seul et même
nt qui s'adapte au parasitisme vis-à-vis de telle ou telle bacté-
a possibilité d'une adaptation implique la nature vivante de
ent qui l'exerce.

ne bornerai à ces citations car si l'on voulait relever tous les
ui militent en faveur de la réalité d'une action vitale, il fau-
reproduire à nouveau toutes les expériences qui figurent dans
vrage : chacune d'elles est une preuve de l'existence de l'ul-
crobe bactériophage, parasite des bactéries.

CHAPITRE V

LE SÉRUM ANTIBACTÉRIOPHAGE (1)

omplexité des anticorps Anticorps vis-à-vis des bactéries Anticorps vis-à-vis des toxines bactériennes Anticorps vis-à-vis des ultramicrobes bactériophages. Anticorps vis-à-vis des lysines

COMPLEXITÉ DES ANTICORPS

Nous nous trouvons encore ici en présence de phénomènes fort omplexes. On sait qu'à une injection d'une culture microbienne, organisme répond par la production de divers principes qu'on a roupés sous le nom d'anticorps, les uns agissant sur les corps microiens : agglutinine, sensibilisatrice, opsonine; les autres, antitoxies et antiferments, neutralisant les produits de sécrétion du iicrobe se trouvant dans le milieu de culture injecté. Si l'on injecte mélange de deux cultures microbiennes, l'organisme répondra ar une double série d'anticorps : c'est ce qui se produit lors de injection d'une culture du Bactériophage.

Une culture du Bactériophage est constituée, comme nous le ivons, par une culture ou une émulsion d'une bactérie lysée sous action du Bactériophage anti doué de virulence pour cette bactée : les germes bactériophages ensemencés se sont multipliés aux épens des corps bactériens dont la substance se trouve, la lyse rminée, dissoute dans le milieu. Une culture de Bactériophage est onc un milieu fort complexe qui renferme .

1° La substance des corps bactériens à l'état dissous ;

2° La toxine bactérienne (exo ou endoxine);

(1) Les expériences relatives au sérum antibactériophage ont été réalisées ec la collaboration de G. Eliava.

3° Les ultramicrobes bactériophages qui se sont développés aux dépens des bactéries ;

4° Les produits résultant de l'activité du Bactériophage, que nous grouperons sous le nom de « lysine », et qui restent dans le milieu une fois la lyse terminée.

Le Bactériophage attaque-t-il la bactérie au moyen d'une seule diastase ou d'un ensemble de diastases? Impossible de le dire à l'heure actuelle ; cela ne change d'ailleurs rien à la question qui nous occupe.

Il pourrait encore y avoir dans la culture une autre catégorie de corps : nous avons vu que les bactéries ne restaient pas passives vis-à-vis de l'action du Bactériophage ; il est fort possible, quoiqu'encore non démontré, que cette défense s'accompagne d'une production d'une anti-diastase, d'une antilysine, qui se trouverait également dans le milieu de culture. Je ne signale le fait que pour mémoire, quoique certaines expériences semblent indiquer qu'il y a réellement production d'une antilysine par la bactérie.

Nous prendrons comme exemple d'un sérum antibactériophage, le sérum antibactériophage-SHIGA, particulièrement intéressant à cause de l'endotoxine puissante du bacille dysentérique.

Injectons à un lapin quatre doses d'une culture de Bactériophage antidysentérique (1), c'est-à-dire d'une culture lysée de bacilles dysentériques de SHIGA, respectivement de 2, 4, 6 et 8 cm³, avec un intervalle de six jours entre chaque injection ; saignée quinze jours après la dernière. Le sérum de ce lapin doit, suivant les théories actuelles, contenir les anticorps suivants :

A. Anticorps vis-à-vis des bactéries : sensibilisatrice et agglutinine.

B. Anticorps vis-à-vis de la toxine bactérienne : antitoxine.

C. Anticorps vis-à-vis des ultramicrobes bactériophages : sensibilisatrice et agglutinine.

D. Anticorps vis-à-vis de la diastase lytique du Bactériophage : antilysine

Voyons si les anticorps contenus dans le sérum répondent à ce qu'exige la théorie.

(1) Comme nous le verrons à propos du Barbone du Buffle, le sérum d'un animal ayant reçu une unique et minime injection de culture du Bactériophage ne présente pas la propriété d'être antibactériophage ou, tout au moins si elle existe, elle n'est pas décelable

ANTICORPS VIS-A-VIS DES BACTÉRIES

Les bacilles dysentériques de Shiga sont agglutinés par le sérum ıtibactériophage, ce dernier renferme également une sensibilisaıce permettant la fixation de l'alexine ; la présence de ces anticorps ait d'ailleurs inévitable et peut être obtenue par l'injection d'un roduit quelconque renfermant des bacilles dysentériques vivants ı morts, entiers ou dissous ; la présence de ces anticorps n'a donc i aucune signification spéciale

ANTICORPS VIS-A-VIS DE LA TOXINE BACTÉRIENNE

Soit, dans le cas présent, contre l'endotoxine dysentérique

Le sérum d'un animal préparé par des injections de bacilles ⁊sentériques, vivants ou morts, contient une antitoxine (1) ; autre part une culture de bacilles dysentériques lysés sous l'action ı Bactériophage renferme la toxine car si on l'injecte aux aniaux d'expérience, peu de temps après la lyse, ces animaux sucımbent comme s'ils avaient reçu une dose mortelle de toxine de ıcolle. Le sérum d'un animal préparé avec de telles cultures doit ınc contenir une antitoxine. Vérifions-le.

Exp. — Une souris reçoit une dose mortelle de toxine dysentérique obtenue r la méthode de Nicolle, par voie sous-cutanée et, en même temps, un mi centimètre cube du sérum antibactériophage-Shiga. Une seconde souris ;oit la même dose de toxine et un demi-centimètre cube de sérum antisentérique Une troisième souris reçoit la dose mortelle de toxine seule. La emière souris meurt une trentaine d'heures après l'injection ; la seconde rvit ; la troisième meurt quatre jours après l'injection.

(1) Le sérum antidysentérique de l'Institut Pasteur est fourni par des cheux préparés par des injections de toxine dysentérique obtenue suivant la ẟthode de Rowland modifiée par Maurice Nicolle ; les corps microbiens sont ɔyés avec du sulfate de soude anhydre ; la poudre obtenue est desséchée ns le vide et dissoute dans de l'eau au moment de l'emploi ; le liquide lou[illegible] est centrifugé, la partie surnageante, limpide, sert pour les injec[illegible] donc une solution de toxine le sérum neutralise l'endo[illegible] le prouve l'expérimentation sur l'animal

Le sérum antibactériophage-Shiga n'est donc nullement antitoxique, bien au contraire, il est nettement sensibilisant. Etudions plus à fond ce singulier phénomène

Exp — Quatre souris reçoivent une dose de toxine égale au dixième de la dose mortelle, par voie sous-cutanée La première est gardée comme témoin ; deux reçoivent 1/5 de cm^3 de sérum antibactériophage-Shiga, la dernière 1/10 de cm^3 de ce sérum La première se maintient indéfiniment bien portante, les deux qui ont reçu 1/5 de cm^3 de sérum meurent après 40 h, la dernière après 54 h

Cette expérience confirme que le sérum antibactériophage-Shiga sensibilise l'animal vis-à-vis de l'action de la toxine. Il faut remarquer que, quelque soit le nombre de doses mortelles de toxine de Nicolle injectées à une souris, la mort ne survient jamais avant le quatrième jour; or, en y adjoignant du sérum antibactériophage à dose minime, la mort survient avant deux jours révolus, même avec une dose bien inférieure à la dose mortelle

Au lieu de toxine, voyons l'effet du sérum antibactériophage-Shiga sur l'injection de bacilles dysentériques vivants.

Exp — Quatre souris reçoivent par voie sous-cutanée une dose de bacilles dysentériques représentant 1/5 de la dose mortelle, la première est gardée comme témoin ; la seconde reçoit, toujours par voie sous-cutanée, 1/5 de cm^3 de sérum antibactériophage-Shiga, les deux dernières 1/10 de cm^3 de ce sérum. La souris témoin survit sans rien présenter d'anormal ; celles qui ont reçu en même temps le sérum meurent de sept à neuf jours après l'injection, après avoir présenté au cours des derniers 24 h la paralysie du train postérieur Les souris ne présentent pas en général ce symptôme à la suite de l'injection de bacilles dysentériques, seul le lapin offre cette particularité

Le résultat est net · dans tous les cas le sérum anti-bactériophage-Shiga est sensibilisant. C'est d'ailleurs le premier exemple d'un sérum anti-immunisant.

Il est possible que le sérum antibactériophage-Shiga renferme en réalité une antitoxine, mais alors celle-ci serait masquée par la présence d'une « sensibilisine » puissante. Ceci est d'autant plus plausible que, comme nous le verrons au chapitre traitant de l'immunisation, un lapin qui ne reçoit qu'une seule injection minime de culture du Bactériophage antydysentérique est solidement vacciné contre les effets de la toxine, la sensibilisine ne se développe chez l'animal qu'à partir de la seconde injection. Le fait n'est pas particulier au cas du dysentérique, nous le retrouverons quand nous étudierons l'immunisation contre le barbone.

Ce phénomène de sensibilisation nécessitera de longues recherches ıi permettront, sans doute, d'approfondir le phénomène de l'immunité antitoxique Une chose paraît déjà certaine, c'est que le ıctériophage doit jouer un rôle dans l'apparition de cette immunité, ıisqu'un sérum antibactériophage sensibilise vis-à-vis de la toxine. est probable que cette sensibilisation de l'animal doit être liée au ›uvoir inhibant dont est doué le sérum antibactériophage, pouvoir ›nt nous aurons à nous occuper dans un instant.

ANTICORPS VIS-A-VIS DES ULTRAMICROBES BACTÉRIOPHAGES

A. AGGLUTININE — Je n'ai pas pu la mettre nettement en évi-:nce, toutefois l'expérience montre que sa présence dans le sérum t probable, en tous cas elle est faiblement active.

EXP. — Une culture de Bactériophage soumise à une centrifugation de minutes à 3 000 tours ne présente pas trace de sédimentation ; nous avons qu'il fallait atteindre 12 000 tours pour obtenir un résultat appréciable ıe culture de Bactériophage est additionnée de 1/10 de sérum antibactério-age et centrifugée pendant 10 minutes à 3 000 tours la numération des tramicrobes effectuée sur le culot et sur le liquide surnageant, après agi-ion énergique prolongée pendant 5 minutes, montre qu'il y a environ trois ıs plus de germes dans le culot que dans le liquide surnageant.

Y a-t-il agglutination? C'est possible mais non certain, l'expé-ɜnce n'est pas assez nette pour permettre l'affirmative La forma-›n d'agglutinine dans le sérum des animaux préparés subit d'ail-ırs de très grandes variations suivant l'espèce microbienne jectée : avec le vibrion cholérique et le bacille typhique, par exem-e, on obtient des agglutinines puissantes, avec certains bacilles ›liformes et le FRIEDLANDER elles sont tellement faibles que leur tion est presque inappréciable. Nous ne savons même pas s'il y a rmation d'agglutinines dans le cas des ultramicrobes pathogènes.

B. SENSIBILISATRICE. — La preuve d'une sensibilisatrice spécifi-ıe pour le Bactériophage antidysentérique, décelable par la réac-›n de fixation du complément de BORDET-GENGOU, ne peut être faite. ı effet, la culture du Bactériophage antidysentérique ne peut être l'une suspension d'ultramicrobes dans un liquide renfermant la

substance dissoute des bacilles dysentériques ; or, le sérum antibactériophage-Shiga contient deux sensibilisatrices, l'une spécifique pour cette substance dissoute, l'autre pour l'ultramicrobe, et il est impossible de séparer les deux actions ; on aura toujours une fixation du complément sans qu'il soit possible de savoir sur lequel des deux antigènes elle se sera effectuée. La question est pourtant résoluble d'une autre manière, bien autrement démonstrative.

Nous avons vu dans les chapitres précédents des faits qui démontrent l'unicité du Bactériophage. Si le fait est réel, la sensibilisatrice contenue dans le sérum antibactériophage-Shiga doit se fixer sur tous les Bactériophages et la preuve de la présence de la sensibilisatrice devient possible, car en opérant sur une culture d'un Bactériophage autre que l'antidysentérique, rien ne vient plus troubler la réaction. Une culture de Bactériophage anti-pesteux, par exemple, est une suspension d'ultramicrobes dans un liquide contenant en solution la substance des bacilles pesteux ; le seul élément commun dans une culture de Bactériophage antidysentérique et dans une culture de Bactériophage anti-pesteux ne peut être que les ultramicrobes bactériophages ; le seul élément anti contenu dans le sérum antibactériophage-Shiga pouvant exercer une action vis-à-vis d'une telle culture, ne peut être qu'une sensibilisatrice pour le seul élément commun à toutes les cultures du Bactériophage : les ultramicrobes bactériophages eux-mêmes.

La réaction de fixation du complément a été faite en utilisant comme anticorps le sérum antibactériophage-Shiga, comme antigènes les cultures de Bactériophage antidysentérique, anti-pesteux souche humaine, anti-pesteux souche murine, et anti-barbone, souche buffaline

Exp. I — Fixation du complément Antigène · culture du Bactériophage anti-Shiga contenant 2.000 millions d'ultramicrobes par cm^3 ; anticorps : serum antibactériophage-Shiga

Antigène 1 cm^3, anticorps 0,2 et 0,1 cm^3 Fixation positive

L'antigène par lui-même fixe le complément.

Exp. II — Antigène culture du Bactériophage anti-Shiga renfermant 100 millions d'ultramicrobes par cm^3, anticorps sérum antibactériophage-Shiga.

Antigène 1 cm^3, anticorps 0,2 et 0,1 cm^3. Fixation positive.

L'antigène ne fixe pas le complément par lui-même.

Exp III. — Antigène . bacilles de Shiga Anticorps . sérum antibactériophage Shiga. Le complément est fixé.

Exp IV. — Antigène Culture du Bactériophage anti-Shiga Anticorps : rum antidysentérique Le complément est fixé

Exp V. — Antigène culture du Bactériophage anti-Shiga Anticorps · ·um antibactériophage-Shiga.
L'antigène, l'anticops et le complément sont mis en présence pendant 1 h }7°, on ajoute alors le système hémolytique

No	Antigène	Anticorps	Complément (au 1/20)	Eau salée	Système hémol	Résultats
—	cc	cc.	cc	cc	cc.	
1	0,75	0,2	0,2	0,35	1	++++
2	0,50	0,2	0,2	0,6	1	++++ (optimum)
3	0,25	0,2	0,2	0,85	1	+++
4	0,75	0,1	0,2	0,45	1	++++
5	0,75	0,3	0,2	0,25	1	++++
6	0,75	0	0,2	0,55	1	Hémolyse totale.
7	0,75	0,2	0,3	0,25	1	+++ (excès alexine)
8	0,75	0,2	0,4	0,15	1	++ (excès alexine)
9	0	0,3	0,2	1,00	1	Hémolyse totale

Exp. VI — Anticorps . sérum anti-bactériophage Shiga.
Antigène : I Bactériophage anti-Shiga, 1 500 millions ultra-microbes par cm^3.
I. Bactériophage anti-barbone, 250 millions ultramicrobes par cm^3.
II. Bactériophage anti-pesteux, souche murine 450 millions ultramicrobes cm^3.
V. Bactériophage anti-pesteux, souche humaine, 700 millions ultramicrobes cm^3

ti-ne	Anti-corps	Sérum lapin normal	Complément 1/20	Eau salée	Système hémol	I	II	III	IV
—	cc	cc	cc	cc	cc.				
	0,2	—	0,2	1,1	1	++++	+++	++++	++++
	0,1	—	0,2	1,2	1	++++	++	+++	++++
	0,2	—	0,2	2,1	1	H T.	H T.	H. T.	H T
	—	—	0,2	1,3	1	H. T	H. T.	H. T	H T.
	—	—	0,2	2,3	1	H T	H. T.	H T.	H T.
	—	0,5	0,2	1,3	1	+	+	+	+

Exp VII — Mêmes antigènes et anticorps que dans l'expérience VI

Antigène	Anticorps	Sérum lapin normal	Complement 1/20	Eau salee	Système hémol.	I	II	III	IV
cc	cc	cc	cc	cc.	cc				
1	0,05	—	0,2	1,25	1	++++	+++	++++	++++
1	0,025	—	0,2	1,3	1	++++	++	++	++++
1	0,005	—	0,2	1,3	1	+++	H T.	H T.	H. T.
1	—	0,05	0,2	1,25	1	H T	H T	H T	H T
1	—	0,025	0,2	1,3	1	H T	H T	H T.	H T
1	—	0,005	0,2	1,3	1	H T.	H T	H. T.	H T
—	0,05	—	0,2	2,25	1	Hémolyse totale			
—	—	0,05	0,2	2,25	1	Hémolyse totale			
1	—	—	0,2	1,3	1	H. T	H T	H. T	H T.
—	—	—	0,2	2,3	1	Hemolyse totale			
—	—	—	—	2,5	1	Pas d'hémolyse			

On remarquera (Exp. VI) que l'antigène fixe légèrement le complément en présence de sérum normal de lapin : rien d'étrange à cela, le Bactériophage étant un hôte normal de l'intestin.

Le sérum antibactériophage contient donc une sensibilisatrice spécifique pour le Bactériophage, quelle que soit la souche, quelle que soit l'espèce bactérienne attaquée, quel que soit l'animal dont il provienne : le Bactériophage est un.

ANTICORPS VIS-A-VIS DE LA LYSINE (1)

Nous avons déjà vu qu'il est possible d'obtenir la lysine sans mélange d'ultramicrobes vivants, en précipitant par l'alcool une culture du Bactériophage.

La culture du Bactériophage s'effectue à l'intérieur même de la

(1) Je répète que j'entends par lysine, l'ensemble des sécrétions du Bactériophage, sans préjuger s'il s'agit d'une diastase lytique unique ou d'un ensemble de diastases, ce qui est plus probable.

bactérie ; l'ultramicrobe ne peut opérer sa pénétration qu'en corrodant la paroi de la bactérie pour se frayer un passage et ne peut évidemment le faire que grâce à une lysine. Si le sérum antibactériophage contient une antilysine, il est évident que la pénétration sera retardée ou même empêchée du fait de la présence de ce sérum neutralisant dans le milieu qui baigne les bactéries, et ce retard ou cet empêchement, suivant la quantité de sérum, se traduira par un retard ou un empêchement dans la lyse des bactéries dans l'intérieur desquelles les ultramicrobes ne pourront plus pénétrer. Le sérum antibactériophage assurera, en un mot, la protection des bactéries, sans pour cela exercer aucune action sur la vitalité des ultramicrobes. C'est effectivement ce qu'on observe.

Le sérum antibactériophage qui a servi à ces recherches était doué d'un pouvoir inhibant considérable : un cent millième de centimètre cube ajouté à 10 cm^3 d'une émulsion de bacilles dysentériques, soit un millionième en volume, retardait déjà notablement la lyse ; avec un millième elle était empêchée. Le fait pourrait évidemment s'interpréter par une destruction pure et simple du Bactériophage, ce qui serait assez étrange, vu qu'aucun sérum anti n'a jamais détruit *in vitro* un microbe, même en présence d'alexine. Je sais que cette affirmation est contraire à l'opinion unanime touchant l'action bactériolytique des sérums anti, j'en montrerai pourtant le bien-fondé au moyen d'une expérience ne laissant place à aucun doute, dans la seconde partie de cet Ouvrage.

En ce qui concerne l'action du sérum antibactériophage sur la lyse, l'expérience suivante montre que le Bactériophage n'est pas détruit, son action seule est inhibée.

Exp — Faisons un mélange à parties égales de sérum antibactériophage-Shiga et de culture de Bactériophage anti-Shiga, laissons cinq jours en contact. Nous nous plaçons donc dans des conditions telles que si le sérum exerce une action destructive sur les ultramicrobes, cette action ne peut manquer de se produire. Après ces cinq jours de contact, trois tubes contenant chacun 10 cm^3 de bouillon stérile sont ensemencés avec une goutte d'une culture en bouillon de bacilles de Shiga ; nous ajoutons au premier de ces tubes une goutte du mélange bactériophage-sérum anti, le second tube reçoit une goutte du premier tube après agitation, le troisième une goutte du second Nous avons donc une série de trois tubes, ensemencés avec du Shiga, contenant une dilution de plus en plus étendue du mélange sérum-bactériophage. Après 24 h de séjour à 37°, on obtient une culture normale de Shiga dans les trois tubes ; les ensemencements de ces cultures sur gélose donnent également des cultures normales. Jusqu'ici le principe lytique semble bien détruit.

Poursuivons l'expérience remettons les trois tubes à l'étuve. 24 h plus tard, la lyse commence dans le premier de ces tubes, un ensemencement sur gélose reste stérile. Les deux derniers tubes, par contre, renferment encore une culture normale de bacille de SHIGA. Replaçons encore les tubes à l'étuve.

24 h. après, c'est-à-dire trois jours après le début de l'expérience, la lyse se manifeste à son tour dans les deux derniers tubes ; tous les réensemencements sur gélose restent stériles

Le Bactériophage n'est donc nullement détruit sous l'action du sérum antibactériophage, son pouvoir était simplement inhibé d'une manière passagère.

L'expérience montre de plus qu'il s'agit d'une véritable action inhibitive, portant sur la totalité des ultramicrobes bactériophages, qu'en d'autres termes, la lyse tardive n'est pas provoquée par la reviviscence de certains ultramicrobes particulièrement résistants, puisque la lyse se produit même dans le dernier tube qui n'a reçu, par suite des dilutions successives, qu'une quantité infime d'ultramicrobes.

La présence dans le sérum antibactériophage d'une anti-lysine va nous permettre d'obtenir un renseignement au sujet de la nature de la virulence de l'ultramicrobe.

EXP. — Dans une émulsion de bactéries de la septicémie du buffle, introduisons une goutte d'une culture du Bactériophage actif pour cette bactérie, puis 10 gouttes du sérum antibactériophage-SHIGA, c'est-a-dire d'une quantité de sérum empêchant totalement la lyse dans une émulsion de bacilles de SHIGA. D'autre part faisons un témoin sans sérum La lyse s'opère normalement et parallèlement dans les deux tubes, donc le sérum anti n'exerce ici aucune action inhibitive

L'action inhibitive ne s'exerce que vis-à-vis de la souche de Bactériophage qui a servi à préparer l'animal qui a fourni le sérum anti (1). D'un autre côté nous savons que toutes les souches du Bactériophage ne diffèrent entre elles que par la virulence, dirigée vers telle ou telle bactérie, et acquise par accoutumance. Il s'en suit que la lysine sécrétée par le Bactériophage n'est pas la même pour les diverses bactéries, puisque l'antilysine ne neutralise que la lysine de la souche qui a servi à la préparation de l'animal qui a fourni le sérum. Chaque espèce bactérienne nécessite donc pour être lysée la

(1) Il est évident que si l'on faisait agir le sérum antibactériophage-SHIGA sur un bacille voisin, sur lequel le bactériophage aurait une certaine activité, on pourrait observer une action inhibitive plus ou moins marquée.

nise en œuvre d'une lysine spécifique : la virulence vis-à-vis d'une)actérie donnée est, en dernière analyse, le pouvoir possédé par le 3actériophage de sécréter une lysine spécifique pour cette bactérie.

Les espèces bactériennes sont réparties par groupes, dans chaque ;roupe les diverses espèces qui le composent présentent entre elles les caractères communs, par exemple, nous avons le groupe *coli*, e groupe typhique (typhique et paratyphiques), le groupe dysenté- ique (bacilles de Shiga, de Hiss, de Flexner, etc.), ces trois grou- ›es eux-mêmes sont assez proches les uns des autres ; nous avons l'autre part le groupe des pasteurella (bactéries des diverses septi- émies hémorrhagiques : choléra des poules, barbone, etc.), le roupe Staphylocoque, etc... Chaque espèce bactérienne nécessite our être attaquée la sécrétion d'une lysine spécifique · la différence ntre chaque lysine spécifique sera peu marquée en passant d'une spèce bactérienne à une autre dans le même groupe ou dans un roupe voisin, le Bactériophage s'accoutumera rapidement ; une ouche quelconque du Bactériophage est en effet généralement active our toutes les bactéries des groupes les plus voisins Par contre accoutumance sera bien plus difficilement acquise pour passer 'une bactérie d'un groupe à une bactérie appartenant à un groupe loigné.

D'un autre côté le Bactériophage parasite normalement les bacté- es intestinales qui constituent son milieu de culture habituel : il ardera donc longtemps la faculté héréditaire d'attaquer les bacilles u groupe coli-typhique-dysentérique, même s'il se développe pen- ant de nombreuses générations aux dépens d'une autre espèce bac- ›rienne.

DEUXIÈME PARTIE

LE ROLE
DU BACTÉRIOPHAGE
DANS L'IMMUNITÉ

INTRODUCTION

echerches sur l'Immunité ont tendu jusqu'à présent à résou-
uestion suivante : quels sont les moyens de défense qui per-
à l'animal *immunisé* ou naturellement réfractaire de résister
:tion? Elles ont abouti à l'établissement de diverses théories.
'ai pas à y faire allusion car mes recherches ont porté sur
t tout différent.

nimal est atteint d'une maladie contagieuse d'origine bacté-
l'immunité *organique*, cellulaire, ne s'établit qu'après un
ariable après le début de la maladie. L'animal reste-t-il sans
jusqu'au moment où cette immunité organique est effective?
·l phénomène peut-il acquérir cette immunité organique?

les animaux *sensibles* exposés à la contagion ne contrac-
is la maladie, pourquoi certains d'entre eux restent-ils
:s?

les points principaux sur lesquels ont porté les recherches
t être exposées. Comme on le voit, il s'agit d'un chapitre
ı de l'étude des moyens de défense contre l'infection et
lusions auxquelles nous conduiront ces recherches ne con-
t en rien les théories actuelles, car elles s'appliquent à des
férents.

cependant un point spécial dans les théories actuelles de
ıité sur lequel je désire attirer l'attention : c'est celui qui a
ı bactériolyse par les sérums spécifiques, précisément par ce
rapporte au sujet traité : la lyse des bactéries.

ait en quoi consiste le phénomène de Pfeiffer : si l'on
dans la cavité péritonéale d'un cobaye préalablement « im-
», une émulsion de vibrions cholériques, on observe une
·mation de ces vibrions en granules. Pfeiffer avait avancé
ransformation en granules constituait la première phase de

la vibriolyse, ce en quoi il était dans l'erreur, car les granules se conservent indéfiniment sous cette forme. « Nous avons beaucoup « cherché cet acte de disparition des granules dans des gouttes pen- « dantes du liquide péritonéal, mais le nombre de ces vibrions « transformés ne diminuait jamais, même après plusieurs jours, et « nous n'avons pas pu non plus saisir le phénomène de la dissolu- « tion des granules. Il est quand même incontestable que la trans- « formation granuleuse est une manifestation de lésions très gra- « ves, subies par les vibrions cholériques sous l'influence du « liquide péritonéal de l'organisme immunisé » (1). La transformation granuleuse est-elle, comme le concède Metchnikoff, une manifestation de lésions très graves? Le fait, constaté par lui, qu'un granule ensemencé sur gélose donne une colonie de vibrions normaux, n'est pas l'indice d'une altération bien profonde. Retenons seulement pour l'instant qu'il n'y a, en aucune manière, lyse des vibrions cholériques dans le phénomène de Pfeiffer. On a cherché de toutes les manières à provoquer le même phénomène chez les animaux les plus divers avec les bactéries les plus variées, mais sans résultats : on ne peut l'obtenir qu'avec les vibrions, seuls susceptibles de se transformer en granules.

Metchnikoff puis Bordet montrèrent que le phénomène de Pfeiffer avait également lieu *in vitro* . il suffisait pour obtenir la transformation granuleuse d'introduire des vibrions cholériques dans le sérum frais d'un animal préalablement immunisé. Bordet montra de plus que cette transformation se produisait sous l'influence de deux principes, la sensibilisatrice et l'alexine.

La sensibilisatrice, thermostabile, est spécifique, c'est-à-dire qu'elle n'est active que vis-à-vis de l'élément contre lequel l'animal fournisseur du sérum a été immunisé ; elle n'existe qu'à l'état de trace, où même est absente, dans le sang de l'animal neuf ; elle se développe sous l'effet de l'immunisation.

L'alexine, thermolabile, est, semble-t-il, unique ; elle existe en aussi grande quantité chez l'animal neuf que chez l'animal immunisé, elle se fixe sur tout élément préalablement touché par une sensibilisatrice spécifique.

Bordet découvrit ensuite que dans le sang d'un animal préparé par des injections de globules sanguins provenant d'un animal d'espèce différente, se formait une sensibilisatrice spécifique : si à

(1) Metchnikoff L'immunité dans les maladies infectieuses, p. 224.

une suspension de ces globules on ajoute du sérum chauffé de l'ani mal préparé, (contenant donc la sensibilisatrice), puis du sérun frais d'un animal neuf (renfermant donc de l'alexine), on obtient l phénomène de l'hémolyse, phénomène qu'on a assimilé à une disso lution des globules alors qu'en réalité, comme BORDET lui mêm l'indique, il y à simplement diffusion de l'hémoglobine, le strome restant intact.

BORDET a enfin montré, d'une manière indirecte, au moyen de la réaction de fixation du complément qui porte son nom, que les bactéries, tout comme les globules rouges, absorbaient la sensibili- satrice spécifique et pouvaient alors fixer l'alexine.

Voici où l'équivoque commence · on a conclu par analogie que du moment que sous l'influence de l'alexine fixée sur les globules grâce à la sensibilisatrice spécifique, il se produisait une hémolyse de ces globules, les bactéries qui absorbent également la sensibilisa trice spécifique et fixent de même alors l'alexine *devaient* nécessai rement subir la bactériolyse. Cette bactériolyse, on n'a jamais pu l'observer directement, ce qui aurait déjà suffit, semble-t-il, à inspi- rer quelques doutes au sujet de la réalité du phénomène L'expé- rience suivante, que j'ai répétée plusieurs fois, montre qu'en réalité les bactéries ne sont nullement détruites dans de telles conditions au contraire, pourrait-on-dire.

EXP. Je prends quatre tubes contenant chacun 20 cm³ d'eau salée à 8 p 1 000 Dans chacun j'ajoute une petite quantité d'une émulsion de vibrions choléri ques de manière à avoir environ un millier de vibrions par centimètre cube d'eau salée

Le premier tube reste comme témoin, tel quel

Le second tube reçoit 0,25 cm³ de sérum frais de cobaye, après m'être assuré de la présence de l'alexine

Le troisième reçoit 0,1 cm³ de sérum anti-cholérique, dans lequel j'ai vérifié la présence de la sensibilisatrice spécifique.

Le quatrième reçoit 0,25 cm³ de sérum frais de cobaye et 0,1 cm³ de sérun anti-cholérique · les vibrions s'y trouvent donc en présence de la sensibilisa trice spécifique et d'alexine.

Je place ces quatre tubes à l'étuve à 37° C., et je vérifie de jour en jour s les vibrions sont morts ou vivants. A cet effet, après 24 heures, j'agite forte ment chacun des tubes et je prélève aussitôt dans chacun d'eux 2,5 cm³ de l'émulsion que j'introduis dans autant de tube de bouillon stérile · le premier de ces tubes reste ordinairement stérile (quatre fois sur six) (1); les trois

(1) Cette action microbicide de l'eau physiologique est assez étrange même quand il s'agit d'émulsions relativement très concentrées, renferman

autres donnent des cultures du vibrion normales dans le second tube ne contenant que l'alexine, agglutinées dans les deux derniers.

Après 48 heures, nouveaux prélèvements effectués comme ci-dessus. Le premier tube reste toujours stérile, le second reste souvent stérile (trois fois sur six); les deux derniers donnent des cultures agglutinées.

Après 3 jours, les prélèvements donnent les résultats suivants : les deux premiers tubes restent toujours stériles, le troisième souvent stérile (quatre fois sur six), le dernier donne toujours une culture agglutinée.

Après 4 jours, les trois premiers tubes restent toujours stériles; le dernier tube seul, c'est-à-dire celui qui contient la sensibilisatrice et l'alexine, donne une culture agglutinée

Même résultat après 6 jours.

La même expérience a été réalisée avec le bacille dysentérique de SHIGA et le sérum anti-dysentérique de l'Institut Pasteur. Le résultat a été en tout semblable les bacilles de SHIGA, comme les vibrions, résistent le plus longtemps dans l'émulsion renfermant le sérum anti et l'alexine

J'ai fait varier de toutes façons les proportions du sérum contenant l'alexine et celles du sérum renfermant la sensibilisatrice ainsi que le nombre de bactéries, le résultat a toujours été semblable : les bactéries résistent plus longtemps en présence d'alexine et de sensibilisatrice que dans l'eau physiologique pure.

de cinquante à cent millions de bactéries (vibrions cholériques ou bacilles dysentériques), par centimètre cube, la stérilisation est totale en quelques heures à la température de 37°. Ces bactéries restent au contraire vivantes pendant plusieurs jours dans de l'eau de robinet. Ce qui est encore plus singulier, c'est qu'on ait adopté l'eau physiologique pour la préparation des émulsions bactériennes, admettant, *à priori*, que les bactéries *devaient* se conserver plus longtemps vivantes dans ce milieu qualifié « d'isotonique ».

Au fond nous retrouvons encore la méthode fausse de déduction par comparaison les globules rouges s'hémolysent en quelques secondes dans l'eau de robinet, par contre ils ne subissent pas l'hémolyse dans l'eau physiologique isotonique, on en a conclu, sans doute, que les bactéries *devaient* se comporter de la même manière En réalité, c'est absolument le contraire qui se produit

Comme nous allons le voir, le même raisonnement a été tenu en ce qui concerne l'action soi-disant bactériolytique des sérums; là aussi, on a abouti à une erreur, et il en sera toujours de même quand on voudra remplacer l'expérience par une déduction basée sur l'analogie, surtout quand il s'agit d'éléments aussi différents qu'une bactérie et un globule rouge.

A propos de l'action toxique du chlorure de sodium, LOEB (*Biochemische Zeitsch.* t. II, p 81, 1906) a constaté que ce sel était toxique pour toutes les cellules vivant dans la mer et que cette action toxique était neutralisée par les sels de potassium et de calcium.

Ces expériences montrent que les vibrions cholériques et les bacilles dysentériques sont rapidement détruits dans l'eau physiologique, que ces bactéries résistent un peu plus longtemps en présence de sérum normal de cobaye frais ou de sérum anti, et enfin qu'elles résistent encore plus longtemps en présence de sérum anti additionné d'alexine. Il est donc bien évident que la bactérie sensibilisée et ayant fixé l'alexine, bien loin de subir la bactériolyse, est plus résistante que la bactérie normale.

Les sérums dits « anti-microbiens » ne jouissent donc, *in vitro*, d'aucune action bactériolytique Tout nous indique qu'il en est de même *in vivo* : on constate parfois que des sérums anti, provenant de chevaux solidement immunisés par des injections de bacilles vivants, sont contaminés par des bacilles de même espèce que ceux qui ont été injectés et qu'il est possible de mettre en évidence par culture. Si la bactériolyse devait se produire, ce devrait pourtant être chez l'animal hyperimmunisé où la bactérie se trouve en présence, dans l'organisme même, de la sensibilisatrice et de l'alexine. En réalité les sensibilisatrices ne sont que des témoins d'infection, comme les agglutinines . les recherches effectuées par de nombreux auteurs au cours des diverses maladies prouvent sans contestation possible qu'il n'existe aucune relation entre ces « anticorps » et l'immunité.

Les sérums dits « anti-microbiens » ont pourtant une action préventive et curative, sans posséder aucune action bactériolytique. Ce sont en réalité des sérums antitoxiques : ils agissent vraisemblablement comme le fait le sérum antidiphtérique par neutralisation des toxines ; l'organisme du malade, mis désormais à l'abri des effets de cette toxine, se débarrasse des bactéries pathogènes, devenues par ce fait inoffensives, comme il le ferait d'une bactérie non pathogène quelconque, c'est-à-dire par phagocytose Le sérum antidiphtérique est uniquement antitoxique pourtant il a une action curative beaucoup plus puissante que celle, par exemple, du sérum antidysentérique; point n'est donc besoin pour expliquer l'action de ce dernier de le supposer « anti-microbien », il est simplement antitoxique, ce qui est suffisant pour expliquer son action.

La prétendue bactériolyse par les sérums des animaux immunisés est un phénomène inexistant, et pourtant on a édifié toute une théorie de l'immunité basée sur les « anticorps anti-microbiens », qui ne sont que des témoins d'infection. Or, nous avons vu dans la première partie de cet ouvrage qu'on pouvait isoler de l'organisme

des convalescents un principe, le Bactériophage, doué d'une action bactériolytique puissante s'exerçant sur les bactéries les plus variées : ce principe ne serait-il pas un agent d'immunité anti-microbienne ? C'est ce que nous allons examiner dans la seconde partie de cet ouvrage.

Une théorie de l'Immunité basée sur de simples observations ou sur des comparaisons, reste toujours sujette à discussion, car la simple observation mène facilement à l'erreur, surtout quand les observations sont effectuées sur des animaux réfractaires et ne se trouvent nullement confirmées quand on passe à l'animal sensible. Il est certes plus facile d'expérimenter dans son laboratoire sur des animaux en cage, d'étudier l'immunité contre le vibrion cholérique, par exemple, sur un cobaye réfractaire à la maladie naturelle, que de courir le monde à la recherche d'épizooties pour pouvoir étudier la maladie dans son cadre normal; seulement le simple bon sens suffit à faire comprendre que la première méthode ne peut rien prouver et que seule l'observation de la maladie naturelle, complétée par l'expérimentation sur l'animal sensible lui-même, peut donner des résultats ayant une valeur absolue Il peut même sembler étrange qu'on ait prononcé le mot « d'immunisation » en parlant d'un animal réfractaire, puisque l'état réfractaire représente déjà l'immunité portée à son plus haut degré.

Désirant me mettre à l'abri de telles critiques, je me suis imposé la marche suivante qui m'a semblé la plus logique.

Nous observerons d'abord la maladie naturelle et nous verrons si la recherche du Bactériophage et de ses propriétés à différents moments de la maladie et de la convalescence, fournit des résultats en rapport avec l'état pathologique du malade. J'ai choisi pour ces recherches des maladies diverses, intestinales et septicémiques, humaines et animales, ce qui nous montrera que la défense par le Bactériophage est un phénomène d'ordre général. Certaines des maladies étudiées sont épidémiques · nous aurons l'occasion de constater le rôle du Bactériophage sur la marche de l'épidémie elle-même. Si le Bactériophage est un agent d'immunité, il ne peut logiquement apparaître au moment précis où le besoin de sa présence se fait sentir ; ce doit être un hôte normal de l'intestin : nous le rechercherons donc chez l'individu sain, en choisissant des sujets dans toute la série animale, ce qui nous montrera la généralité de la présence du Bactériophage.

Nous tenterons enfin la contre-épreuve : si chez l'animal sensible,

principe de l'immunité anti-microbienne réside dans le Bactériohage, l'administration à l'animal sensible d'un Bactériophage actif ontre une bactérie donnée doit rendre l'organisme réfractaire à la aladie causée par cette bactérie.

Grâce à la bienveillance de M Roux, directeur de l'Institut Pasteur et de M. Yersin, directeur des Instituts Pasteur d'Indochine, ai pu réaliser en entier le programme que je m'étais tracé. En rance j'avais eu l'occasion d'étudier le rôle du Bactériophage dans es maladies intestinales ; au cours d'un séjour d'une année a l'Institut Pasteur de Saïgon j'ai pu vérifier la généralité des phénomènes bservés, par l'étude d'un septicémie éminemment contagieuse, le barone du Buffle, et d'une maladie a localisation ganglionnaire, la peste.

Il est certain qu'une théorie de l'Immunité basée sur le Bactériohage, c'est-à-dire sur un organisme autonome, est tellement en ehors de toutes les conceptions actuelles, qu'elle suscite de suite incrédulité et que le qualificatif de « théorie finaliste », synonyme 'anti-scientifique, lui est de suite accolée. J'avoue que ma manière e voir ne me permet pas de comprendre ce que pourrait être la nalité. « Etre c'est lutter, vivre c'est vaincre » à très justement dit e Dantec : toute l'idée est d'ailleurs contenue dans un seul mot : voluer. Un être qui évolue est nécessairement un être qui vit, qui adapte et qui vainc ; du moment qu'il cesse de s'adapter, d'évoluer, meurt. L'évolution se fait toujours suivant la loi du moindre effort : s organismes pluricellulaires ont profité pour assurer leur défense u parasitisme du Bactériophage vis-à-vis des bactéries, qui n'est n somme qu'un chapitre de la lutte universelle. Si, parmi tous les res, seules les bactéries avaient échappé au parasitisme, que serait-il rrivé ? C'est bien simple : de deux choses l'une, ou l'évolution 'aurait pas franchi le stade de l'être unicellulaire, ou alors l'évoluon se serait faite suivant une autre voie et l'immunité assurée par 'autres moyens ; simple question d'adaptation. Le Bactériophage 'existe pas pour défendre les organismes supérieurs contre les bacéries, il existe simplement parce qu'au cours de l'évolution certains iicrobes en ont parasité d'autres. Rien dans la Nature n'existe en ue d'un but, car la Nature n'a pas de but : qu'il existe sur un ionde des êtres animés ou qu'il n'y en ait pas, l'incident est paritement négligeable. Cette manière de voir est-elle finaliste ? Peu nporte d'ailleurs : une théorie scientifique est vraie ou fausse suiant les preuves sur lesquelles elle se base.

Chaque fois qu'il sera parlé au cours de cet ouvrage de « l'immunité antimicrobienne » il faudra entendre « immunité antimicrobienne chez l'individu sensible » la seule, comme je l'ai déjà fait remarquer, à laquelle se rapportent les observations et les expériences.

J'ai peu étudié jusqu'à présent les phénomènes d'immunité chez l'animal réfractaire. Il semble bien, qu'en général, dans l'immunité spéciale qui caractérise l'état réfractaire, l'élimination des bactéries qui parviennent à s'introduire dans l'organisme (bactéries par conséquent non pathogènes pour l'espèce en cause), s'effectue par phagocytose Dans ce cas spécial, la défense par le Bactériophage n'aurait d'ailleurs pas, la plupart du temps, l'opportunité de s'exercer, la phagocytose se produisant alors trop rapidement pour que le Bactériophage ait le temps d'exalter sa virulence vis-à-vis de la bactérie qui s'introduit dans l'organisme.

CHAPITRE PREMIER

LE BACTÉRIOPHAGE DANS LA MALADIE

Choix des maladies d'étude Dysentérie bacillaire Infections à *B. coli* Fièvres typhoïde et paratyphoïdes. Typhose aviaire. Barbone Peste bubonique. lacherie Conclusions

CHOIX DES MALADIES D'ÉTUDE

Au point de vue de l'immunité, l'étude des maladies humaines ffre un inconvénient : l'homme est intangible pour l'expérimentaeur, la simple observation est seule permise, d'un autre côté l'étude 'une maladie humaine, la typhoïde ou le choléra, par exemple, hez l'animal réfractaire, et ils le sont tous, ne peut conduire qu'à es résultats illusoires. L'étude de la maladie animale permet au ontraire toutes les expériences de vérification sur l'animal naturellement sensible lui-même, là, l'erreur n'est plus possible. Seulement cette méthode de travail est beaucoup plus compliquée : la aladie ne vient pas à vous, il faut aller à elle.

L'étude de la typhoïde et de la dysenterie nous permettra de monrer par l'observation le rôle du Bactériophage au cours de la malaie, nous retrouverons les mêmes phénomènes au cours des malaies animales et nous pourrons, avec ces dernières, tenter toutes s expériences de vérification qui confirmeront ce que la simple bservation nous aura montré.

Pour se rendre compte de l'influence du Bactériophage sur l'état orbide, une méthode qui consisterait à rechercher au hasard l'activité du Bactériophage dans un échantillon de matières prélevées à

un moment quelconque ne pourrait conduire à aucun résultat ; il faut prendre le malade à un moment aussi proche que possible du début de la maladie et pratiquer chaque jour, jusqu'à guérison complète, l'examen des déjections. Les résultats journaliers sont ensuite traduits en une courbe qui est superposée à celle qui exprime l'état général . nombre de selles pour la dysenterie, température pour la typhoïde. La comparaison de ces deux courbes permet de tirer une conclusion. Cette manière d'opérer nécessite un travail considérable, on doit pourtant s'y soumettre, car c'est la seule qui autorise une conclusion.

Nous avons vu au cours des précédents chapitres que la virulence d'une souche du Bactériophage était bien rarement limitée à une seule espèce bactérienne, mais s'exerçait en général, avec une intensité variable, sur plusieurs espèces appartenant au même groupe ou à des groupes voisins.

Il aurait été pratiquement impossible, vu la longueur des opérations, de rechercher la totalité des bactéries attaquables par un Bactériophage isolé à un moment donné des déjections d'un patient : je me suis donc limité à rechercher systématiquement dans chaque cas la virulence du Bactériophage vis-à-vis de la bactérie pathogène en cause, et cela sur une souche type de cette bactérie entretenue depuis longtemps au laboratoire, et sur la souche provenant du patient lui-même, ainsi que vis-à-vis de *B. coli*. Eventuellement j'ai étendu la recherche aux bactéries appartenant au même groupe ou à des groupes voisins.

Nous savons que la virulence de diverses souches du Bactériophage vis-à-vis d'une bactérie donnée est loin d'être constante, elle varie suivant une gamme qui va de zéro à une activité telle qu'il suffit d'ajouter quelques germes à une émulsion chargée de cette bactérie pour obtenir en 3 ou 4 h. une lyse totale et permanente : toutes les bactéries étant alors détruites. Entre ces deux limites, virulence nulle et virulence extrême, tous les intermédiaires sont possibles. Une virulence faible, nous l'avons vu, est susceptible d'être exaltée *in vitro*, mais, en ce qui concerne l'étude de l'immunité, ce qui nous intéresse c'est la virulence présentée par le Bactériophage dans l'organisme au moment même de l'observation, soit la virulence actuelle du Bactériophage contenu dans le filtrat directement obtenu avec les déjections, à un moment donné de la maladie.

Comme nous l'avons vu également, l'aspect des cultures du Bactériophage, en bouillon et sur gélose, nous permet d'apprécier sa

virulence vis-à-vis de la bactérie en expérience. Pour faciliter les explications nous adopterons une échelle de virulence fixée comme suit :

o, virulence nulle vis-à-vis d'une bactérie donnée, soit cultures normales de la bactérie en bouillon et sur gélose, quelle que soit la quantité de filtrat de déjections qu'on y ajoute ;

+, virulence faible : culture en bouillon de la bactérie à laquelle on a ajouté le filtrat, paraissant normale ; l'étalement de cette culture sur gélose, après incubation, donne une culture en nappe parsemée de quelques plages ; quelques germes bactériophages virulents ont donc attaqué des bactéries et formé des colonies ;

++, virulence moyenne : culture de la bactérie à laquelle a été ajouté le filtrat, à peu près normale en bouillon ; l'étalement de cette culture sur gélose après incubation, donne, soit une culture en nappe de la bactérie parsemée de très nombreuses colonies de Bactériophage, soit des fragments de culture bactérienne à cause du très grand nombre de colonies du Bactériophage ;

+++ ,virulence forte : on obtient la lyse de l'émulsion bactérienne en bouillon mais avec culture secondaire constante. Les réensemencements sur gélose restent stériles ou ne donnent que de rares colonies de la bactérie,

++++, virulence extrême : lyse totale et en général permanente en bouillon ; réensemencements sur gélose toujours stériles.

On pourrait évidemment établir une échelle de virulence plus serrée (c'est d'ailleurs ce qui a été fait pour les courbes qui seront données où l'intervalle entre la virulence nulle et la virulence extrême a été partagé en dix échelons, toujours suivant l'aspect des cultures, le nombre plus ou moins grand de colonies du Bactériophage, et l'étendue de la plage qui est en rapport avec la virulence), pratiquement l'appréciation est suffisante avec quatre échelons, étant surtout donné le fait de l'extrême variabilité de la virulence du Bactériophage dans l'organisme d'un même individu d'un moment à un autre.

L'expression : Shiga ++++, Hiss +, Flexner o, Typhique ++, Para A o, Para B o, Coli +++, signifiera donc que le Bactériophage contenu dans le filtrat obtenu avec les déjections d'un individu présente une virulence extrême vis-à-vis du bacille dysentérique de Shiga, une virulence faible vis-à-vis du bacille dysentérique de Hiss, une virulence moyenne vis-à-vis du bacille typhique et une virulence forte vis-à-vis du Colibacille, aucune

action sur le bacille dysentérique de FLEXNER ni sur les paratyphiques A et B.

DYSENTERIE BACILLAIRE

Mieux que toutes les explications les courbes ci-jointes montrent les relations qui existent entre l'état du patient et la virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis de la bactérie pathogène. Le tracé supérieur donne le nombre de selles par 24 h., trait simple pour les selles non sanglantes, trait double pour les selles muqueuses et sanglantes.

Les cinq cas donnés comme exemple ont été traités à l'hôpital Pasteur, j'ai donc pu les suivre avec toute l'attention nécessaire et obtenir des prélèvements aussi répétés que les recherches l'exigeaient : au moins un, souvent plusieurs, au cours de chaque journée (1). J'ai choisi pour ces exemples des cas de gravité diverse; dans tous, j'ai isolé des selles le bacille de SHIGA au début de la maladie.

1. GERMAINE MEL., 16 ans (fig. 1). Dysenterie très légère. Pensionnaire dans une institution où se trouvaient une trentaine de jeunes filles Du 12 au 22 juillet une vingtaine de ces pensionnaires présentent des troubles intestinaux à début brusque, se traduisant par une diarrhée abondante, avec amendement rapide des symptômes ; un ou deux jours après le début tout était rentré dans l'ordre. Dans deux cas seulement une ou deux selles contenaient des traces de sang. Dans le but d'établir le diagnostic, la directrice fut priée d'envoyer une malade à l'hôpital, dès le premier symptôme.

GERMAINE MEL. entre à l'hôpital le 18 juillet. De la première selle émise à l'arrivée je pus à grand'peine isoler un bacille présentant les caractères biochimiques du bacille de SHIGA, mais inagglutinable; ce ne fut qu'après trois passages sur gélose que l'agglutination put être obtenue (1 pour 500).

Comme on le voit sur le tracé, les selles séreuses, de 17 le pre-

(1) Je tiens à remercier les sœurs, infirmières à l'hôpital Pasteur qui, avec une complaisance inlassable, ont effectué les nombreux prélèvements qui m'ont permis de suivre l'état des malades

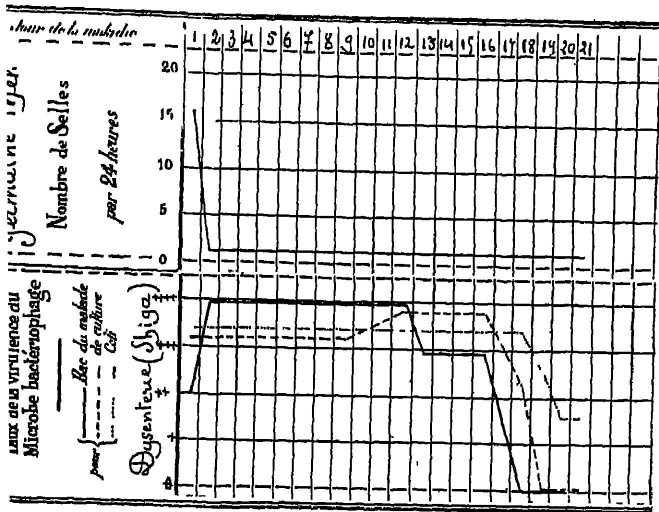


Fig 1

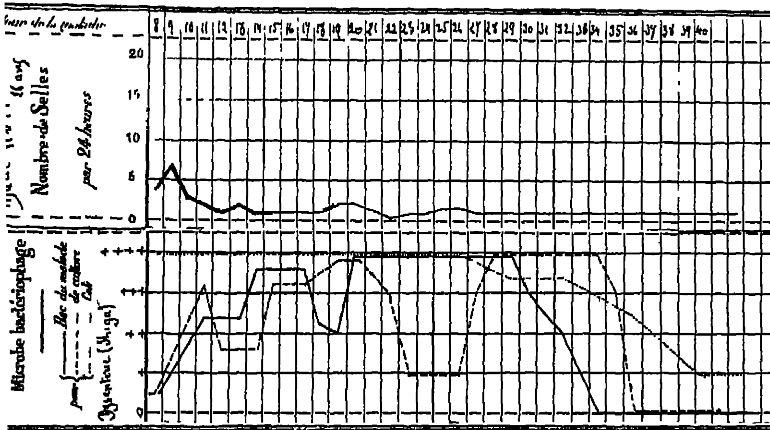


Fig 2.

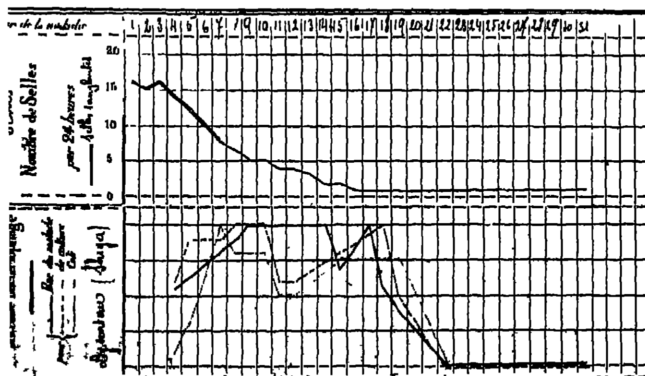


Fig. 3.

mier jour tombèrent brusquement à 2 le lendemain, sans médication. Le Bactériophage intestinal de la malade était doué, dès le premier jour (isolé de la cinquième selle) d'une virulence extrême vis-à-vis du bacille de la malade et d'une virulence moindre vis-à-vis d'un bacille de SHIGA type et du *B. coli*

J'examinai les déjections de onze des pensionnaires, parmi lesquelles neuf avaient présenté des troubles intestinaux deux ou trois jours auparavant, deux n'avaient présenté aucun symptôme morbide ; toutes contenaient un Bactériophage présentant une virulence forte ou extrême vis-à-vis du bacille isolé des déjections de GERMAINE MEL... ; ainsi que vis-à-vis d'un bacille de SHIGA type et du *B coli*.

Donc, chez GERMAINE MEL . , Bactériophage au maximum d'activité dès le début de la maladie ; guérison dans les 24 h

MARIE LEB. ., 26 ans (fig. 2), dysenterie légère à bacille de SHIGA ; selles muqueuses sanguinolentes typiques. Entre à l'hôpital le huitième jour de la maladie ; première selle sanglante l'avant-veille.

Les déjections renferment, dès l'entrée à l'hôpital, un Bactériophage actif contre le bacille de SHIGA type (+), extrêmement actif contre *B. coli* (++++), très faiblement actif contre le bacille de la malade (+). Contre ce dernier bacille la virulence augmente au cours des trois journées suivantes, atteint son taux limite (++++), fléchit (++) puis remonte définitivement (++++) : l'état de la malade enregistre ces fluctuations. A la fin de la convalescence il ne reste qu'une légère activité (+) du Bactériophage vis-à-vis de *B coli*.

VICTOR KER..., 5 ans (fig. 3). Dysenterie de moyenne intensité à bacille de SHIGA, contractée par contact avec le malade suivant. Entre à l'hôpital le troisième jour de la maladie. A ce moment le Bactériophage intestinal manifeste déjà une virulence moyenne (++) vis-à-vis d'un bacille de SHIGA type aussi bien que vis-à-vis du bacille du malade, cette virulence augmente rapidement et se maintient très élevée jusqu'à complète convalescence (++++), puis elle cesse brusquement de se manifester.

JEAN KER..., 6 ans (fig. 4), frère du précédent. Entre à l'hôpital le troisième jour de la maladie ; état général mauvais, de vingt à

trente selles sanglantes par jour. Dysenterie grave à bacille de SHIGA.

Le quatrième jour de la maladie, 24 selles sanglantes ; Bactériophage faiblement actif contre *B. coli* (+), inactif vis-à-vis du bacille de SHIGA.

Jour	Nombre de selles sanglantes	Virulence du Bactériophage vis-à-vis de :		
		SHIGA du malade	SHIGA type	*B. coli*
5e	23	0	+	+
6e	13	0	++++	++
7e	9	0	+++	++++
8e	12	0	++	++++
9e	11	0	+	++++
10e	12	+	++++	+++
11e	12	+++	++++	+++
12e	(4 plus 6 non sanglantes)	+++	++++	+

à partir de ce moment l'amélioration est de plus en plus marquée. L'activité du Bactériophage ne cesse qu'une fois la convalescence bien établie.

Dans les trois premiers cas l'attaque de dysenterie a été légère : le Bactériophage a été actif d'emblée, la bactérie n'a pas acquis de résistance, sa culture a été de suite étouffée. Dans le dernier cas, il y a eu lutte, acquisition d'une certaine résistance finalement vaincue, la maladie a déjà été plus grave.

Veuve LANS..., 70 ans (fig. 5) ; dysenterie extrêmement grave à bacille de SHIGA. Entre à l'hôpital le second jour de la maladie.

Dans ce cas la lutte se prolonge avec des alternatives : il se forme dans l'intestin une culture mixte à alternances, l'état de la malade enregistre fidèlement les péripéties de la lutte ; on peut noter particulièrement que le Bactériophage manifeste une activité momentanée le onzième jour de la maladie, les selles perdent à ce moment leur caractère sanglant ; mais le bacille exalte sa résistance ce qui lui permet de se développer, le sang reparaît dans les selles. La maladie n'est définitivement vaincue qu'à partir du moment où la virulence du Bactériophage est suffisamment élevée pour dominer la résistance de la bactérie.

Outre les cinq cas cités comme exemples, j'ai suivi, tant en France qu'en Indochine, dix-sept autres cas de gravité diverse avec obser-

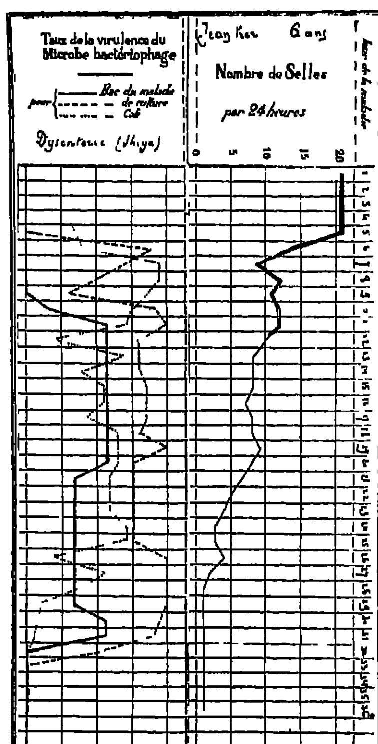


Fig 4

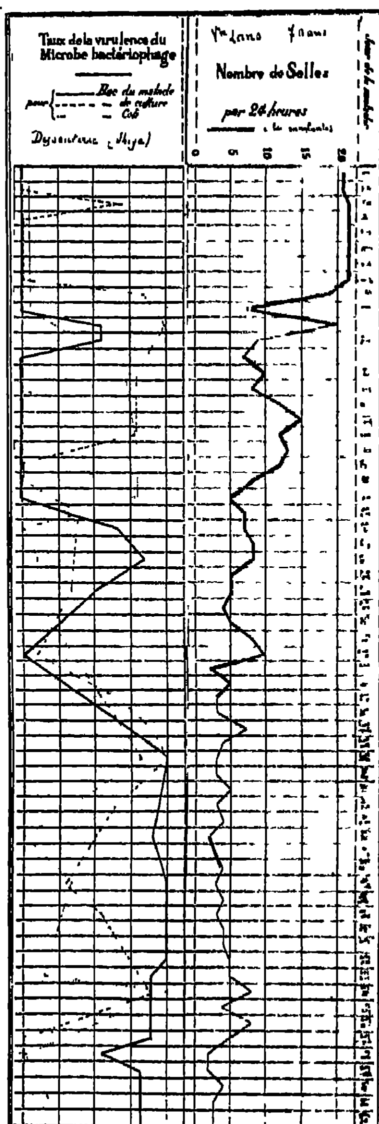


Fig. 5.

vations journalières et vingt-neuf avec observations moins suivies : dans tous les cas l'activité du Bactériophage s'est manifestée d'une manière identique ;

1° en cas de guérison, la virulence du Bactériophage commence à se manifester d'une manière marquée vis-à-vis de *B. coli* ;

2° la virulence s'étend ensuite au bacille de Shiga type, c'est-à-dire vis-à-vis d'une souche depuis longtemps en culture et par conséquent ne jouissant d'aucune résistance ;

3° elle se manifeste ensuite plus ou moins rapidement vis-à-vis du

bacille de SHIGA isolé des selles du malade au début de la maladie (1) ;

4° dans tous les cas les fluctuations de la virulence ainsi que les fluctuations de la résistance de la bactérie marchent de pair avec l'état du malade et le début de l'amélioration coïncide avec le moment où la virulence du Bactériophage domine nettement la résistance de la bactérie. Nous retrouvons *in vivo* le même mode d'action du Bactériophage qu'*in vitro* : lyse permanente et définitive, culture mixte à réensemencement négatif, culture mixte à alternances.

J'ai eu l'occasion, en Indochine, de suivre quatre cas mortels de dysentérie bacillaire chez des indigènes : à aucun moment de la maladie je n'ai trouvé trace d'activité du Bactériophage intestinal vis-à-vis du bacille de SHIGA, souche type ou souche isolée des déjections du patient.

Un dernier cas offre un intérêt spécial car il montre que ce n'est pas seulement *in vitro* que les bactéries peuvent devenir réfractaires à l'action du Bactériophage, mais également *in vivo* : ces cas doivent d'ailleurs être très rares et même exceptionnels, comme on va le voir.

ALIX DESP..., 56 ans, entre à l'hôpital Pasteur le 26 septembre 1919. Diarrhée muqueuse, 30 à 40 selles par jour. L'isolement des bactéries intestinales donne une culture à peu près pure d'un bacille dysentérique présentant des caractères atypiques.

Bacille immobile, GRAM négatif, donne de l'indol, ne noircit pas la gélose au plomb, ne vire pas les milieux au rouge neutre ; sur gélose sucrée tournesolée, n'attaque aucun sucre. En milieu de BARSIEKOW, maltosé et lactosé, pas de virage ; glucosé et mannité, vire au rouge. Après 6 repiquages sur gélose s'agglutine au taux limite (1 pour 6 000) sous l'action d'un sérum agglutinant le bacille de HISS, s'agglutine au 1/400 sous l'influence d'un sérum anti-FLEXNER dont le taux limite est 1/6 000 ; ne s'agglutine pas au 1/20 par un sérum anti-SHIGA.

Malgré ces caractères atypiques c'est donc un bacille de HISS jouissant de propriétés fermentatives faibles. Au sortir de l'organisme ce bacille n'était pas touché par un Bactériophage très viru-

(1) Il faut évidemment conserver cette souche sans repiquages : on ensemence les colonies isolées obtenues sur les plaques d'isolement sur plusieurs tubes de gélose et l'on part directement de ces tubes pour tous les essais effectués au cours de la maladie. On sait que la résistance s'atténue par repiquages successifs.

lent pour le bacille de HISS normal ; il était lysé après une douzaine de repiquages. C'était donc un bacille réfractaire au Bactériophage, au sortir de l'organisme.

J'isole en même temps des selles de la malade une souche du Bactériophage présentant les virulences suivantes : SHIGA o ; FLEXNER ++ ; HISS de culture ++++ ; coli + ; HISS de la malade +. Après douze repiquages de ce dernier bacille j'essaye de nouveau la virulence du filtrat : j'obtiens la lyse parfaite ; il avait donc perdu sa résistance par passages sur la gélose.

Le Bactériophage de la malade est donc actif au maximum contre un bacille de HISS de culture, très peu actif sur le bacille de la malade avec lequel il forme, *in vitro,* des cultures mixtes indéfiniment repiquables. Il y a également dans l'organisme de la malade culture mixte du Bactériophage et du bacille de HISS réfractaire.

En dépit de tous les soins, d'injections répétées de sérum antidysentérique, la malade s'affaiblit de plus en plus, la température oscille entre 38° le matin et 40° le soir ; le nombre de selles augmente peu à peu, devient incomptable vers le trentième jour ; à partir de ce moment la malade tombe dans le marasme, la température se maintient aux environs de 38° ; elle succombe le trente-cinquième jour.

L'état bactériologique des selles, vérifié chaque jour, se maintient à peu près constant, le bacille pathogène toujours très abondant, souvent en culture à peu près pure et présentant les caractères décrits. La virulence du Bactériophage s'accroît sans cesse, à partir du quinzième jour sa virulence reste fixe :

SHIGA ++++, FLEXNER ++++ ; HISS ++++ ; typhique +++, paratyphique A +++ ; paratyphique B +++ ; coli ++++ ; bacille de la malade fraîchement isolé o, complètement réfractaire (après 15 repiquages +++).

A l'autopsie (1) j'isole du contenu du colon, d'un fragment de muqueuse ulcérée, du foie, de la rate et du sang du cœur le bacille dysentérique de HISS, présentant les mêmes caractères que celui que j'avais isolé au début de la maladie. De tous les organes je pus également isoler un Bactériophage présentant les mêmes caractères que celui qui avait été isolé des selles et dont la virulence vient d'être indiquée.

Ce cas, tout à fait exceptionnel (je crois que c'est le premier cas

(1) Pratiquée par L. GÉRY que je remercie pour les prélèvements qu'il a bien voulu me remettre

té d'une septicémie à bacille de Hiss) est très intéressant car il ontre d'une manière indiscutable le rôle que joue le Bactériophage ins la défense de l'organisme. Dans tous les cas étudiés auparaınt, nous avons vu la guérison se produire dès que le Bactériolage acquiert la virulence suffisante pour dominer le bacille thogène. Dans ce dernier cas la bactérie a pu acquérir l'état fractaire, le Bactériophage est vaincu et reste sans action quelle ie soit sa virulence ; désormais plus de barrière, la bactérie se veloppe sans entrave et envahit tout l'organisme : la malade sucmbe à une septicémie à bacille de Hiss.

Ce cas exceptionnel nous fournit un renseignement nouveau. Une actérie est pathogène pour un organisme donné si elle sécrète des roduits nocifs pour les cellules de cet organisme ; elle est virulente de plus elle peut se développer aux dépens de cet organisme. Les acilles dysentériques sont pathogènes sans pour cela être virulents ir ils n'envahissent pas l'organisme mais restent cantonnés dans intestin et la muqueuse intestinale. Pourtant dans le cas de la mme Desp..., le bacille dysentérique de Hiss s'est trouvé doué ccidentellement d'une virulence extrême, et cela uniquement arce que le Bactériophage a été vaincu ; d'où la notion, que nous errons s'affirmer au cours des chapitres suivants, que la virulence 'une bactérie à un moment donné est d'autant plus grande que sa ésistance au Bactériophage est à ce moment plus élevée.

Le cas Desp... est exceptionnel ; en règle générale, la mort surient dans la dysenterie, non pas par suite de l'acquisition par la actérie de l'état réfractaire, mais par défaut d'accoutumance du Bactériophage à la bactériophagie vis-à-vis de la bactérie pathogène, omme nous l'avons vu plus haut dans les quatre cas mortels cités t dans lesquels aucun Bactériophage actif vis-à-vis du bacille de Shiga n'a pu être isolé à aucun moment de la maladie.

Au cours d'une épidémie de dysenterie ayant sévi au début de 'automne 1918 dans la région parisienne, j'ai eu l'occasion d'observer 29 cas de diarrhée bénigne : dans tous ces cas j'ai isolé, d'un échantillon de selles prélevées le lendemain du malaise, un Bactériophage d'une activité forte ou extrême vis-à-vis du bacille de Shiga, bacille qui était en cause dans tous les cas graves étudiés à la même époque.

Séjournant en ce moment dans une localité (Meulan) ou plusieurs

cas graves de dysenterie furent signalés à côté de très nombreux cas de diarrhée passagère, j'ai examiné les selles de neuf personnes saines mais vivant au contact d'individus ayant présenté de la diarrhée, dans ces neuf cas j'ai isolé un Bactériophage d'activité moyenne ou forte vis-à-vis du bacille de SHIGA. Nous avons vu plus haut que le même fait a été observé dans l'institution où GERMAINE MEL... avait contracté la dysenterie. Les individus exposés à la contagion et qui résistent présentent donc dans leur intestin un Bactériophage virulent pour le bacille pathogène en cause, tout comme les individus atteints qui guérissent.

Il en résulte qu'en période épidémique les cas de diarrhée simple doivent être en réalité des dysenteries bacillaires avortées, grâce à une rapide adaptation du Bactériophage intestinal à la bactériophagie vis-à-vis de la bactérie pathogène et que les personnes saines, vivant au contact des individus atteints, même légèrement, ne sont épargnées que grâce à une adaptation plus rapide encore, s'opérant avant tous symptômes morbides. Nous retrouverons des faits semblables pour toutes les maladies qui vont être étudiées.

En résumé, la pathogénie et la pathologie de la dysenterie bacillaire sont dominées par deux facteurs agissant en sens contraire : le bacille dysentérique agent pathogène, le Bactériophage agent d'immunité. L'histoire d'un cas de dysenterie n'est que l'histoire de la lutte engagée dans l'organisme entre ces deux facteurs et l'état du malade enregistre fidèlement les péripéties de cette lutte.

Dans le cas d'une rapide exaltation de la virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis du bacille pathogène, ce dernier ne peut acquérir la résistance, il est détruit sans lutte ; la maladie avorte avant tout symptôme ou ne se manifeste que par un trouble passager

L'exaltation de la virulence du Bactériophage vis-à-vis du germe envahisseur peut être retardée .

1° par suite de circonstances intestinales défavorables (nous avons vu l'importance considérable, *in vitro*, de variations très faibles dans la réaction du milieu sur le développement des ultramicrobes bactériophages). Suivant l'état chimique et physique du contenu intestinal, telle bactérie se trouve favorisée par rapport à telle autre, les fermentations intestinales, et par conséquent la réaction du milieu, varient suivant la flore prédominante. Le développement du Bactériophage se trouve donc doublement influencé, d'abord par

uite du changement d'état du milieu lui-même, et ensuite par la ransformation de la flore qui raréfie ou augmente, suivant les cir-onstances, les espèces bactériennes aux dépens desquelles il se léveloppe normalement, ce qui l'oblige à des variations de virulence n rapport avec la variation des espèces bactériennes. On connaît l'ailleurs depuis longtemps l'influence de la diarrhée catarrhale provoquée par l'ingestion d'aliments indigestes, de fruits verts en articulier, ou par le « froid au ventre », si redouté dans les pays ropicaux) sur l'éclosion de certaines maladies intestinales, la dysen-erie et le choléra entre autres.

2° Par suite du degré plus ou moins grand de résistance au Bac-ériophage du bacille envahisseur. Nous avons vu qu'au cours de la naladie le bacille pathogène se défend, un tel bacille en état de ésistance, ingéré par un individu sain pourra se développer malgré a présence d'un Bactériophage peu actif qui aurait détruit sans lutte n bacille non résistant.

Dans les cas de dysenterie bacillaire même très graves, mais dans esquels l'état du patient s'améliore rapidement, le Bactériophage nanifeste sa présence d'une manière très active d'emblée, tant sur es souches de laboratoire que sur le bacille du malade lui-même, et ela à partir du moment où les symptômes commencent à s'amender. l y a exaltation rapide de la virulence du Bactériophage sans résis-ance de la bactérie.

Dans les cas où la maladie se prolonge, deux cas sont à consi-érer :

1° le Bactériophage ne manifeste qu'une action nulle ou peu mar-uée tant que l'état du patient se maintient stationnaire, l'amélio-ation se produisant dès que l'activité du Bactériophage se mani-este d'une manière énergique tant pour les bacilles de culture que our le bacille provenant du malade lui même Il y a eu retard ans l'accoutumance, puis acquisition brusque d'une virulence éle-ée : la guérison s'est effectuée aussitôt, car la bactérie pathogène 'a pu acquérir la résistance.

2° à un moment donné de la maladie la virulence du Bactério-hage se manifeste pour les bacilles de culture, d'une manière plus u moins énergique, par contre elle reste inappréciable ou très fai-le sur les cultures du bacille provenant du malade lui-même. Il y eu retard dans l'accoutumance puis le Bactériophage a acquis raduellement la virulence pour le bacille pathogène, ce qui a laissé n temps suffisant pour la création d'une race résistante de ce der-

nier, dès lors il y a lutte et l'état du patient enregistre les péripéties de cette lutte.

Cette lutte est particulièrement marquée dans les formes de longue durée et à rechute; dans ces dernières surtout la virulence du Bactériophage subit des fluctuations journalières, elle peut, à certains moments, être extrême pour les bacilles de culture, quoique toujours relativement faible vis-à-vis du bacille du malade. La guérison suit de près le moment où l'action du Bactériophage se manifeste d'une façon aussi intense pour l'une comme pour l'autre souche.

La maladie a une issue fatale dans deux cas :

1° Le Bactériophage n'exerce pas son action protectrice, par défaut d'accoutumance vis-à-vis de la bactérie pathogène : il n'y a pas lutte, la bactérie se développe librement. Dans l'immense majorité des cas cette non accoutumance est la cause de la mort qui survient alors rapidement.

2° Dans certains cas exceptionnels, la bactérie pathogène acquiert peu à peu la résistance absolue, l'état réfractaire; le Bactériophage, quel que soit le degré de virulence qu'il puisse acquérir, reste sans action. La bactérie à partir de ce moment lutte à égalité avec le Bactériophage, l'organisme entier est envahi et la mort du patient est fatale, après un temps plus ou moins long.

INFECTIONS A COLIBACILLE

Le Colibacille peut parfois jouer un rôle pathogène : on l'a signalé comme étant l'agent de diverses infections localisées, il peut même provoquer des septicémies. Il semble étrange au premier abord qu'une bactérie si commune, hôte normal de l'intestin, puisse à un certain moment devenir pathogène ; il doit exister « quelque chose » qui différencie ce coli pathogène d'un coli banal. C'est ce que j'ai voulu vérifier. J'ai pratiqué l'examen de cinq échantillons d'urine infectée provenant d'individus atteints de pyélonéphrite ; or, dans ces cinq cas, j'ai constaté qu'il s'agissait, non pas du Colibacille seul, mais d'une culture mixte Coli-Bactériophage (le simple ensemencement de l'urine sur gélose permettait d'obtenir une culture de coli parsemée de plages dans un cas, dans les quatre autres l'étalement sur gélose d'une culture en bouillon donnait le même aspect),

ans laquelle le coli était doué d'une forte résistance, sans pour ɔla être réfractaire : la lutte se poursuivait dans l'organisme. Le *. coli* ordinaire n'est pas pathogène, le *B. coli* résistant le devient u fait même de sa résistance à l'action du Bactériophage.

L'histoire d'un état morbide, c'est l'histoire de la lutte entre le actériophage qui attaque avec sa virulence d'une part et une bactérie usceptible de résistance de l'autre : la lutte peut se poursuivre 'autant plus longtemps que la bactérie secrète des produits moins oxiques pour l'organisme au sein duquel se poursuit la lutte, mais nalement c'est toujours l'issue de cette lutte qui décide du sort de et organisme.

Nous aurons l'occasion de revenir sur le cas de la pyelonéphrite quand nous aurons à parler des « porteurs de germes ».

FIÈVRES TYPHOIDE ET PARATYPHOIDES

Comme je l'ai fait pour la dysenterie bacillaire et en observant la nême méthode, j'ai suivi plusieurs cas de typhoïde de gravité liverse ; quatorze, en traitement à l'Hôpital Pasteur dont les déjec-.ions ont été examinées au moins une fois par jour au cours de la naladie et de la convalescence ; et quatorze autres cas en traitement lans divers hôpitaux avec examens moins suivis.

Je choisis comme exemple des cas de gravité diverse.

1° Fièvre typhoïde ou paratyphoïde à allure bénigne, cliniquement typiques, mais avec hémoculture et coproculture négatives.

Ci-joint les courbes de trois de ces cas.

Marie Mo..., 55 ans (fig. 6).
Louis Pi..., 17 ans (fig. 7).
François Jod..., 34 ans (fig. 8).

J'ai recherché dans ces cas la virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis des divers bacilles intestinaux, Coli, Typhique, Paratyphiques A et B, et Bacille dysentérique de Shiga. Je crois inutile de commenter les observations, l'examen des courbes est plus démonstratif que toutes les explications. Le tracé supérieur donne la température.

Quel était le bacille en cause dans chacun de ces trois cas ? Il est

bien difficile de poser un diagnostic à l'aide du Bactériophage qui, comme nous l'avons vu, acquiert bien rarement une virulence uni-

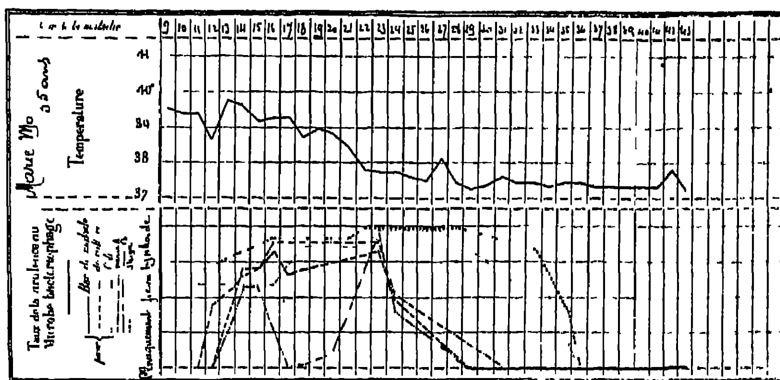


Fig 6

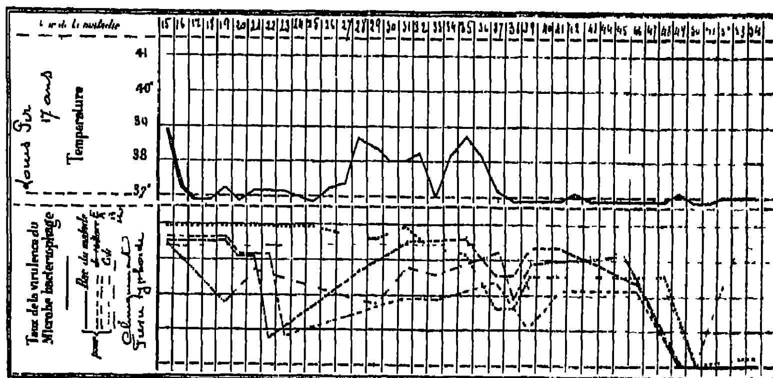


Fig. 7.

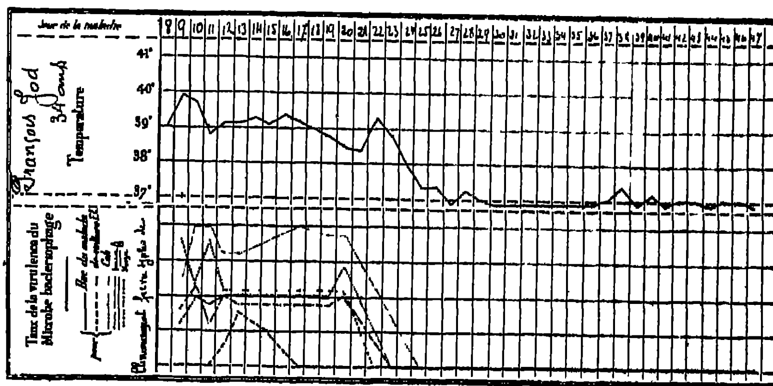


Fig. 8.

que , cette virulence s'étend aux autres bactéries du même groupe à un plus ou moins fort degré, et ce fait est précisément marqué

ıand il s'agit de l'un des représentants du groupe Coli-Typhique-ysentérique. Il semble pourtant que dans le cas de Louis Pi. ., bacille en cause ait été le Bacille typhique, le Paratyphique A ıns le cas de Marie Mo ., et le Paratyphique B dans celui de ançois Jod...

A noter que ces trois cas dans lesquels l'amélioration a été rapide, présentent des courbes de virulence du Bactériophage compara-es. On voit que dans tous, la virulence accessoire pour le Bacille 'sentérique de Shiga et le Colibacille est très élevée et que l'acqui-ion de la virulence pour les Bacilles typhique et paratyphiques et B est précoce et se maintient élevée jusqu'au début de la con-lescence.

Dans le cas de Louis Pi..., le brusque fléchissement de la viru-nce le 22e jour précède la petite rechute qui se produit du 25e au e jour; cette très légère complication ne présente aucune gravité r la virulence du Bactériophage remonte graduellement dès le e jour.

2° Typhoïdes graves avec hémoculture et coproculture positives, utes à Bacille typhique.

1° Renée Mar..., 32 ans (fig 9). Le Bactériophage est d'abord rulent pour le *B. coli*, le reste durant toute la maladie, la con-lescence et persiste lors de la sortie de l'hôpital après guérison mplète. A noter que l'acquisition de la virulence par le Bactério-age contre le bacille de la malade coïncide avec la première fervescence, puis cette virulence cesse, la température remonte. ı maladie est définitivement vaincue au moment où cette virulence tablit franchement.

2° Juliette Ou. ., 36 ans (fig. 10).
3° Jeanne Del..., 20 ans (fig. 11).

Ces courbes s'expliquent d'elles-mêmes.

3° Fièvre typhoïde à rechute.
Gilberte Fon..., 4 ans (fig. 12).

Au 16e jour la maladie semble terminée, pourtant la virulence du ıctériophage vis-à-vis du bacille de la malade cesse de se manifes-r avant la fin de la crise et la destruction des bactéries pathogènes

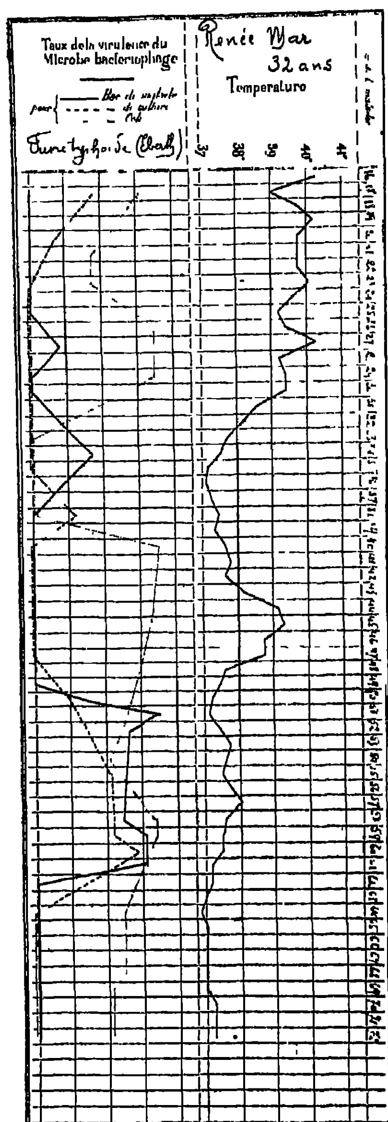


Fig. 9.

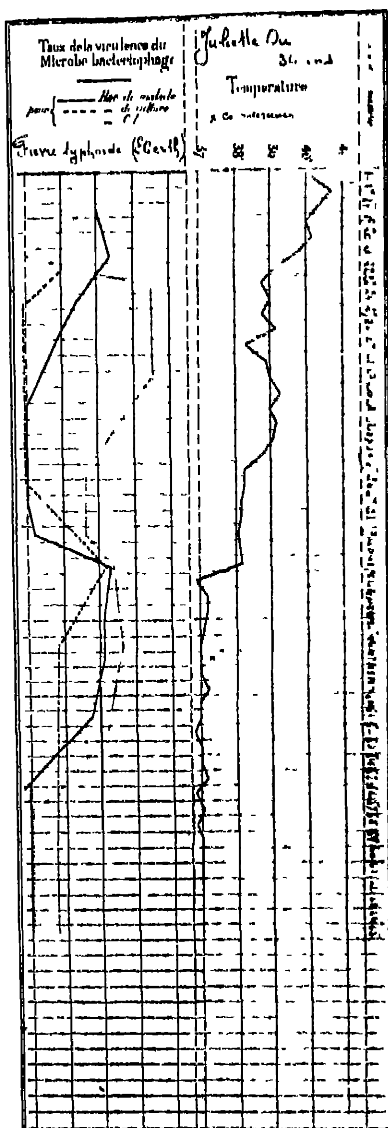


Fig. 10.

n'est pas complète ; d'où une rechute très grave qui ne s'amende que lorsque le Bactériophage récupère une virulence suffisante pour dominer la résistance de la bactérie.

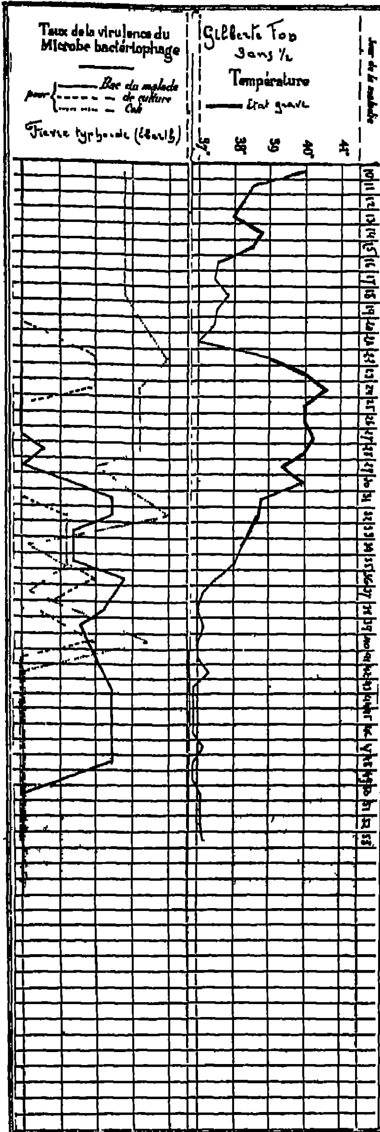


Fig 11.

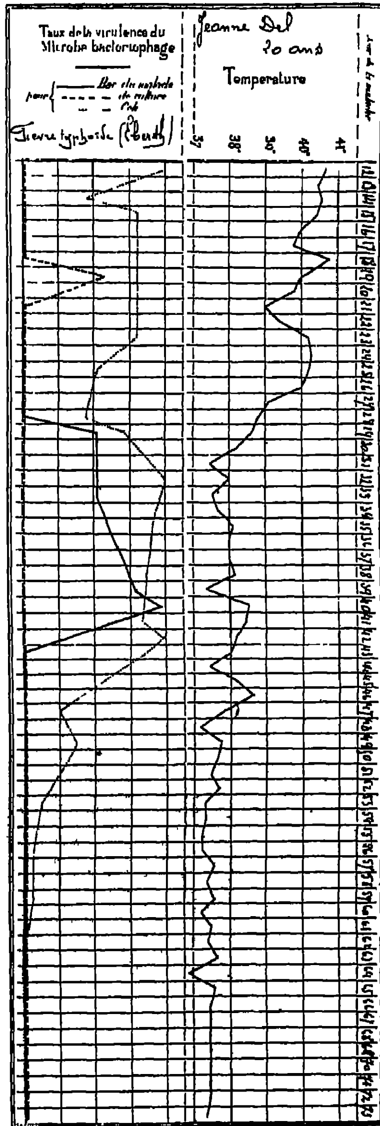


Fig 12

4° Fièvre typhoïde d'extrême gravité.
ANDRÉE DESS..., 30 ans (fig. 13)
JEANNE COT..., 24 ans (fig. 14).

Dans ces deux cas j'ai isolé à diverses reprises des bacilles typhiques des déjections au cours de la maladie ; ces bacilles présentaient une résistance marquée à l'action d'une souche très active du Bactériophage anti-typhique et perdaient cette résistance par une dizaine de repiquages sur gélose. Il est à remarquer qu'à leur sortie de l'organisme ces bacilles étaient inagglutinables (ce fait a été fréquemment signalé), ils ne devenaient agglutinables qu'après une série de cultures ; cette inagglutinabilité passagère est, comme nous l'avons vu, liée à la résistance à l'action du Bactériophage.

L'examen des courbes montre nettement la lutte qui se poursuit dans l'organisme entre la bactérie et le Bactériophage et les répercussions de cette lutte sur l'état des malades.

Nous retrouvons donc dans la fièvre typhoïde, maladie intestinale se compliquant de septicémie, les mêmes faits que dans la dysenterie bacillaire

La virulence de l'ultramicrobe bactériophage isolé des déjections d'un typhique ne se limite pas, en général, au seul bacille pathogène, elle s'étend au même moment, et d'une manière plus ou moins marquée, à quelques-uns ou à tous les bacilles du groupe Coli-Typhique-Dysentérique Le fait est particulièrement marqué dans les cas de gravité faible ou moyenne. Dans les cas graves l'action bactéricide est plus spécifique et se limite souvent au bacille pathogène et au *B. coli*, qui, lui, est toujours attaqué. Dans certains cas très graves la spécificité devient telle qu'au début de l'amélioration définitive, seul le bacille isolé provenant du malade lui-même est attaqué, qu'il ait d'ailleurs été obtenu par coproculture ou par hémoculture, à l'exclusion des bacilles provenant, soit de souches de laboratoire, soit de souches récemment isolées d'autres malades. Il semble donc qu'au cours de leur lutte chacun des deux organismes en présence, Bactériophage et bactérie, acquièrent une personnalité propre qui les différencie des organismes de même espèce banalisés par la culture. Ce particularisme s'efface d'ailleurs par cultures successives, tant pour le Bactériophage qui, après quelques passages aux dépens du bacille qui lui est sensible, devient apte à se développer aux dépens de n'importe quelle souche du Bacille typhique, que pour le Bacille typhique qui peut alors être attaqué par n'importe quelle souche de Bactériophage anti-typhique.

La typhoïde n'est pas une maladie purement intestinale comme la

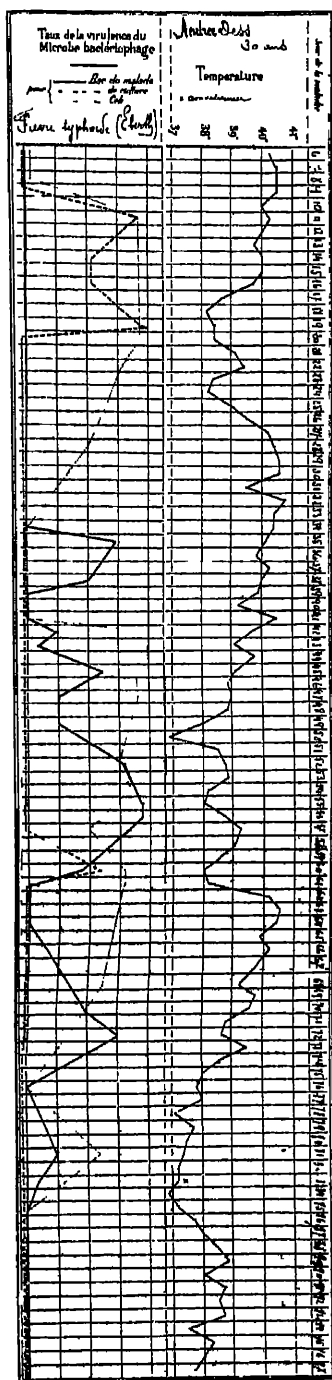

Taux de la virulence du
Microbe bactériophage
Temperature

Fig. 14.

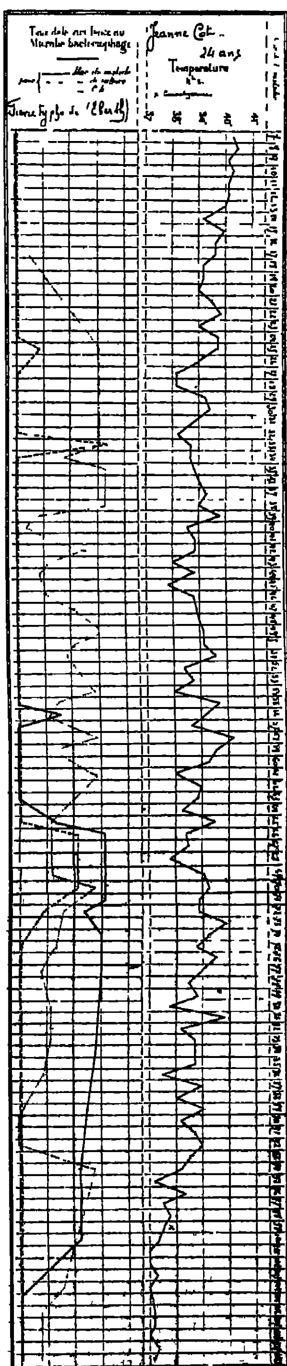

Temperature

Fig. 15.

dysenterie. Dans cette dernière on comprend que, du moment où toutes les bactéries pathogènes qui se trouvaient dans l'intestin ou dans la muqueuse, c'est-à-dire à proximité des ultramicrobes, ont été détruites, la maladie cesse *ipso facto*. Dans la typhoïde il y a en plus septicémie et la destruction des bactéries contenues dans l'intestin, si elle est de nature à empêcher l'éclosion de la maladie ou à l'enrayer dès son début, ne suffit plus pour juguler l'infection, une fois que les bactéries pathogènes ont envahi l'organisme.

Nous verrons par la suite que l'action protectrice du Bactériophage ne se limite pas à l'intestin. L'intervention du Bactériophage, dans l'organisme même, peut se manifester de diverses manières.

Nous avons vu au chapitre traitant des propriétés du Bactériophage que les produits qu'il secrète jouissent d'un pouvoir opsonique extrêmement élevé Une culture de Bactériophage anti-typhique est précipitée par l'addition de quatre volumes d'alcool à 96° ; on laisse le précipité en contact avec l'alcool pendant 48 h., temps suffisant pour assurer la destruction complète des germes bactériophages. Un centigramme du précipité humide est dissous dans 10 cm³ d'eau salée. En cherchant l'indice opsonique, on voit que sous l'action de la lysine les leucocytes se chargent de bacilles typhiques en quantité tellement grande qu'il est impossible de faire une numération exacte des bacilles phagocytés : l'indice opsonique dépasse certainement 50. Il est possible que la lysine secrétée dans l'intestin aussitôt que le Bactériophage a acquis une virulence suffisante pour dissoudre les bacilles typhiques, soit résorbée et passe dans la circulation, ce qui assurerait la destruction des bacilles par phagocytose

D'autre part l'ultramicrobe bactériophage lui-même, ne reste pas strictement cantonné dans l'intestin, il passe à un moment donné dans la circulation. Je n'ai pu le vérifier chez l'Homme car il n'est pas possible de pratiquer sur un malade les prises de sang répétées que nécessiterait une telle recherche. J'ai tourné la difficulté en m'adressant à la paratyphoïde du Rat provoquée par l'ingestion de culture d'une souche très virulente de *B. typhi murium*. J'ai à diverses reprises constaté le passage momentané de l'ultramicrobe bactériophage dans le sang prélevé par ponction cardiaque, entre le quatrième et le sixième jour après le repas infestant : tous les rats chez lesquels ce phénomène s'est présenté abritaient à ce moment un Bactériophage actif contre la bactérie pathogène dans leur intestin ; tous ont de plus résisté à l'infection.

En troisième lieu nous verrons expérimentalement que les produits dissous se trouvant dans les cultures du Bactériophage provoquent, après un temps d'incubation, l'apparition d'une immunité « organique » tellement puissante qu'elle confine à l'état réfractaire. Ces produits dissous se forment également dans l'intestin du malade, et même dans l'organisme puisqu'il peut y avoir passage du Bactériophage dans la circulation à la faveur de la septicémie.

En plus des vingt-huit cas de typhoïde non mortels étudiés en vue de déterminer l'influence du Bactériophage sur la marche de la maladie, j'ai observé trois cas mortels : dans ces trois cas, à aucun moment de la maladie je n'ai pu constater une activité du Bactériophage vis-à-vis du Bacille typhique, soit contre une souche de culture, soit contre le propre bacille du malade. J'ai en outre pu examiner des échantillons du contenu intestinal prélevé sur cinq cadavres d'individus morts de typhoïde, d'aucun je n'ai pu isoler un Bactériophage présentant une virulence quelconque pour le Bacille typhique, et pourtant le Bactériophage n'était pas absent puisque dans six de ces huit cas j'ai pu en déceler la présence par suite d'une activité moyenne vis-à-vis du Colibacille ; le Bactériophage était donc présent mais avirulent pour le bacille pathogène. La mort dans la typhoïde se produit, en général, par suite d'un défaut d'accoutumance du Bactériophage à la bactériophagie vis-à-vis du bacille envahisseur.

La mort peut-elle survenir par suite de l'acquisition de l'état réfractaire par le Bacille typhique, ce qui le met à l'abri de l'action du Bactériophage, comme nous avons vu le fait se produire dans la dysenterie? C'est extrêmement probable mais je n'ai pas eu l'occasion de le constater.

Tant dans la typhoïde que dans la dysenterie, la recherche de la virulence du Bactériophage pourrait servir à l'établissement du pronostic : il suffirait de vérifier simultanément la virulence du Bactériophage intestinal du malade vis-à-vis de *B. coli*, du bacille pathogène provenant du patient et d'un Bacille typhique de culture. La comparaison de ces trois données fournirait le renseignement demandé. La constatation de la résistance de la bactérie pathogène serait de nature à assombrir le pronostic et cela d'autant plus que cette résistance serait élevée.

En résumé, dans tous les cas de typhoïde étudiés, quelle qu'en ait

é la gravité, l'apparition chez l'ultramicrobe bactériophage de la rulence pour le bacille pathogène a été précédée d'une exaltation e la virulence pour *B. coli*, qui a toujours débuté au cours du econd septenaire et a rapidement atteint une grande intensité; ette activité s'est maintenue durant tout le cours de la maladie et 'a cessé de se manifester d'une manière appréciable que dans le ourant de la convalescence, parfois même plus tard. Par contre apparition de la virulence pour le bacille pathogène a varié suivant degré de gravité de la maladie. Dans les cas de gravité faible ou oyenne, l'activité du Bactériophage s'est manifestée pour ce bacille vant la fin du second septenaire et a cessé vers le début de la conalescence . l'activité a donc été parallèle pour *B. coli* et le Bacille yphique. Dans les cas graves, l'activité pour le Bacille typhique n'a ommencé à se manifester d'une manière énergique que vers le ébut de l'amélioration définitive; elle a persisté plus ou moins ongtemps; dans certains cas jusque vers le milieu de la convalesence.

Dans les formes à rechute et à recrudescence la lutte se complique lu fait de l'acquisition de la résistance par la bactérie et ce n'est u'au déclin de la rechute ou de la recrudescence que la virulence lu Bactériophage se montre suffisante pour dominer définitivement a résistance de la bactérie; l'activité du Bactériophage se maintient usqu'à la pleine convalescence, c'est-à-dire jusqu'au moment où, ar suite de la destruction totale des bactéries pathogènes, l'ultranicrobe ne peut plus se développer à leurs dépens.

Dans tous les cas l'état du malade enregistre fidèlement les périétıes de la lutte engagée dans l'organisme entre le Bactériophage t le Bacille envahisseur.

TYPHOSE AVIAIRE

La typhose aviaire. — La typhose aviaire est une maladie qui évit principalement sur les Gallinacés ; malgré sa fréquence elle est estée longtemps ignorée, confondue avec le choléra des poules ; ette dernière maladie est en réalité très rare. En 1919, recherchant les épizooties dans le but de vérifier dans des maladies animales, ermettant l'expérimentation, les constatations faites sur le rôle du Bactériophage dans la dysenterie et la typhoïde humaines, on me

signala l'existence d'un foyer étendu de « choléra des poules » dans le département de l'Aube Dès les premiers examens je pus constater l'erreur commise, il s'agissait de la maladie connue aux États-Unis sous le nom de « Fowl typhoid » et dont l'existence n'avait pas encore été reconnue en France. J'ai ensuite constaté la présence de nombreux foyers répartis sur toute l'étendue du territoire

La Fowl typhoide, que j'ai appelé typhose aviaire, est une maladie très intéressante ; l'étude se trouve compliquée du fait de l'existence de plusieurs « paratyphoses » ce qui la rapproche encore plus de la typhoïde humaine

L'agent pathogène, *B. gallinarum*, KLEIN, dont l'étude a été reprise par MOORE sous le nom de *B. sanguinarum*, présente, à la mobilité près, tous les caractères du bacille d'EBERTH, il est même agglutiné au taux limite par un sérum anti-typhique. A côté de ce bacille type, on trouve souvent, dans les mêmes foyers, des bacilles présentant des réactions agglutinatives et biochimiques différentes ; le type clinique de la maladie qu'ils provoquent ne diffère pas de celui de la typhose type. Ces diverses espèces bactériennes n'ont été jusqu'ici étudiées que par les savants américains, PH HANDLEY entre autres, qui a décrit : *B. pullorum* A et B, *B. jeffersonii*, *B. rettgerei* et *B. pfaffi*. Je ne m'étendrai pas sur les caractères distinctifs de ces divers bacilles, ce qui ne présenterait aucune utilité pour l'étude que nous poursuivons (1); qu'il suffise de savoir qu'en France, au cours de l'épizootie de 1919, l'agent pathogène le plus fréquent a été *B. gallinarum* type (trouvé 57 fois sur 73 examens). J'ai en outre trouvé, à côté de *B. gallinarum* : *B. pullorum A* (1 fois), *B. pullorum B* (6 fois), *B. jeffersonii* (4 fois), *B. pfaffi* (4 fois). Dans un seul foyer, dont le centre se trouvait au village de Trainel (Aube), il s'agissait uniquement de paratyphose à *B. pfaffi* sans mélange de typhose vraie.

Le type clinique ne varie guère, quel que soit le bacille en cause. Voici une observation type

Le 24 mai au soir, la poule paraît en parfait état. Le 25 au matin elle reste à terre au poulailler, triste, elle se laisse prendre sans défense ; le même jour, vers midi, aspect somnolent, plumes hérissées, yeux mi-clos, crête légèrement violacée, l'animal ne mange pas, ne boit pas, il reste accroupi « en boule ».

(1) Les lecteurs que la question intéresserait trouveront tous les renseignements utiles dans le mémoire de PH. HANDLEY : The colon-typhoid intermediates as causative agents of diseases in birds. *Agricultural Experiment station of the Rhode Island College Bulletin*, n° 174, mai 1918.

Inspirations profondes, 25 à la minute ; diarrhée jaune verdâtre avec parties jaune franc L'état empire dans l'après-midi, elle tombe sur le flanc vers vingt heures et meurt quelques minutes après

Nécropsie : crête violacée, peau marbrée de taches de même couleur, foie volumineux, congestionné, présentant des foyers de dégénérescence ; péricardite.

A l'examen microscopique direct, le sang paraît stérile : après de minutieuses recherches je trouve trois bacilles sur toute une préparation. Le sang et les organes ensemencés donnent une culture pure de *B. gallinarum*, qui se trouve également, très abondant, dans le contenu intestinal.

La mort survient parfois plus rapidement encore, dans certains cas d'une manière foudroyante.

Les épizooties de typhose aviaire sont extrêmement meurtrières. En 1919 il en existait des foyers sur toute l'étendue du territoire français En général l'épizootie débute brusquement : en l'espace de trois à quatre semaines, la moitié, les trois quarts, parfois plus, des poules d'une ferme succombent ; puis la maladie prend un caractère sporadique, il ne meurt plus qu'un animal de temps à autre, et cela pendant des années ; la maladie cesse parfois de se manifester pendant quelques mois puis reparaît ; la mortalité annuelle varie de 40 à 70 o/o de la population des poulaillers. Les adultes jeunes sont les plus sensibles, puis les vieux ; les poussins sont en général épargnés.

Les épizooties de typhose s'étendent rapidement sur de vastes territoires : certains départements étaient en totalité contaminés en 1919 La constitution d'un nouveau foyer débute par l'importation du germe morbide d'une région infestée, soit par l'intermédiaire d'un troupeau de moutons ou de bœufs, soit par des cavaliers (ce dernier mode de contamination a dû être souvent en cause durant la guerre, ce qui expliquerait l'extension de la maladie au cours des années 1917 et 1918). La maladie sévit pendant quelques jours dans une ferme, passe aux fermes voisines et se répand ensuite rapidement dans les villages environnants.

La bactérie pathogène se conserve vivante et virulente pendant plusieurs mois dans les endroits ou a sévi la maladie : j'ai vérifié à plusieurs reprises qu'un poulailler isolé infecté, nettoyé et laissé inoccupé pendant six à huit mois renfermait encore des germes virulents car, repeuplé avec des poules provenant d'une région saine, la maladie se manifestait peu de jours après chez les nouveaux occupants

La typhose aviaire étant une maladie peu connue en général, j'ai

cru utile d'entrer dans certains détails qui permettront de mieux comprendre les faits qui vont être exposés.

Rôle du bactériophage sur le cours de la maladie. — Vu la gravité exceptionnelle de la typhose aviaire, je n'ai eu l'occasion de suivre que quatre cas qui se sont terminés par la guérison ; dans tous, le tableau a été identique.

Le matin la poule reste au poulailler, « en boule », les plumes hérissées, elle présente la diarrhée caractéristique. L'aspect est en somme le même que celui des poules qui succomberont

A ce moment l'examen des déjections donne comme résultats :

B. gallinarum : très abondant.

Bactériophage intestinal : Coli + (dans 2 cas) ou ++ (dans 2 cas). *B. gallinarum* o (dans les 4 cas).

Hémoculture (ensemencée avec quelques gouttes de sang prélevées aseptiquement par piqûre à la crête), positive dans les deux cas où elle a été effectuée.

Au cours de la journée l'état est semblable à celui des animaux qui succomberont, seulement cet état se prolonge, le lendemain matin la poule présente encore le même aspect L'examen des déjections donne alors les résultats suivants .

B. gallinarum présent dans 3 cas, absent dans 1.

Virulence du bactériophage intestinal : Coli +++ (4 cas) ; pour *B. gallinarum* : + (dans 3 cas), +++ (dans 1 cas).

Vers midi, dans un cas, dans le courant de l'après-midi dans les trois autres, je prélève quelques gouttes de sang : l'hémoculture reste négative ; par contre, dans trois cas, je vérifie la présence dans le sang du Bactériophage actif pour *B. gallinarum* ; le sang qui est ultrastérile est précisément celui de la poule dont l'état est le meilleur à ce moment et qui ne présentait déjà plus de bacilles pathogènes dans l'intestin le matin. La présence du Bactériophage dans le sang est extrêmement fugace.

Le troisième jour au matin, l'aspect de l'animal est meilleur, il boit beaucoup, mange quelques graines, la diarrhée est moins abondante. L'examen des déjections donne :

B. gallinarum : absent dans les quatre cas.

Virulence du bactériophage intestinal : vis-à-vis du coli +++ (4 cas) ; de *B. gallinarum* +++ (dans 3 cas), ++++ (dans 1 cas).

Hémoculture : négative, ni bacilles ni ultramicrobes.

Le quatrième jour l'animal est à peu près normal.

Chez les quatre poules guéries, le Bactériophage intestinal est esté très longtemps actif vis-à-vis de *B gallinarum* : après trois nois il présentait la même activité que lors de la guérison. L'une l'elles, qui a pu être examinée après cinq mois, le présentait encore ıussi actif qu'au début. Nous verrons expérimentalement que cette)ersistance dépend uniquement du fait que le bacille pathogène, ·épandu à profusion dans le milieu extérieur, est fréquemment ngéré par l'animal ce qui entretient la virulence du Bactériophage ntestinal qui peut continuer à se cultiver à ses dépens.

J'ai examiné les déjections d'une centaine de poules mortes de yphose aviaire, dans aucun cas il n'existait de Bactériophage actif ıs-à-vis de *B. gallinarum* ou de l'un des bacilles agents des parayphoses Le Bactériophage était pourtant présent, car il pouvait tre décelé (91 fois sur 97 examens) par suite de son activité maniieste vis-à-vis de l'une ou de plusieurs des espèces du groupe Coli-Typhique-Dysentérique On voit donc nettement que l'absence de léfense n'est pas due à l'absence du Bactériophage, mais uniquenent au fait que le Bactériophage intestinal reste passif par suite le l'absence d'acquisition de la virulence pour le bacille pathogène.

En résumé, comme dans la dysenterie et la typhoïde humaines, 'acquisition de la virulence par le Bactériophage intestinal vis-à-vis le la bactérie pathogène est la condition *sine quâ non* de la guérison.

RÔLE DU BACTÉRIOPHAGE SUR LE COURS DE L'ÉPIZOOTIE. — L'épizooie de typhose aviaire m'a permis d'étudier le rôle du Bactériophage, non plus seulement dans la maladie, mais encore sur le ours de l'épizootie.

Constatons d'abord un fait touchant les régions indemnes de yphose; au cours des trois dernières années j'ai pratiqué 81 examens de déjections d'animaux de basses cours, tant en France qu'en ndochine, dans des régions ou aucune épizootie n'avait sévi sur les olailles depuis plusieurs années. J'ai isolé dans chacun de ces 1 échantillons un Bactériophage actif contre une ou plusieurs des actéries du groupe Coli-Typhique-Dysentérique, mais dans aucun as le Bactériophage n'a présenté d'activité décelable vis-à-vis de 3. *gallinarum*.

La situation est tout autre dans les régions contaminées.

Je donnerai d'abord comme exemple les observations faites dans e ferme située à Pougy-sur-Aube ou j'ai pu suivre la maladie de s près.

La maladie débuta en 1917, en juillet ; 51 poules adultes sur 98 :combèrent en l'espace d'un mois, puis l'épizootie s'arrêta. Elle)rit en mai 1918 sous une forme moins violente : 25 poules sur 4 succombèrent de mai à septembre, nouvel arrêt. En 1919,)rise au début d'avril, le 21 mai, 21 poules sur 80 étaient mor- ; c'est à ce moment que j'ai commencé les observations.

21 mai, je prélève les excréments de 30 des 59 survivantes. Un amen effectué ultérieurement au laboratoire donne comme résul- : 26 renferment un Bactériophage d'activité faible ou moyenne -à-vis de *B gallinarum* (23 +; 3 ++) ; absence dans 4.

22 mai. Deux poules contractent la maladie ; les échantillons pré- és la veille ayant été numérotés, je constate lors de l'examen, bsence du Bactériophage actif dans les déjections de ces deux imaux.

23 mai. Une des deux poules atteintes la veille, succombe.

24 mai. Une troisième poule, malade le matin, meurt la nuit sui- nte. Ses déjections prélevées le 22 ne contenaient pas de Bactério- age actif vis-à-vis de *B. gallinarum*.

Le matin du 24 la poule atteinte le 22 et qui a résisté, présente ns son contenu intestinal un Bactériophage d'une activité extrême -++++) vis-à-vis du bacille pathogène.

26 mai. La quatrième poule, dont les déjections ne contenaient pas Bactériophage actif vis-à-vis de *B. gallinarum* le 22, est atteinte son tour, elle résiste ; le 28 tous les symptômes ont disparu. Cette ule est d'ailleurs la dernière atteinte, la maladie disparaît brusque- ent ; trois mois après aucun nouveau cas n'était survenu.

30 mai. Je prélève les déjections de 30 poules. L'examen donne résultat suivant :

Activité vis-à-vis de *B. gallinarum* : chez 5 : ++++ ; chez : +++ ; chez 4 ++.

Nous voyons donc : le 22 mai, chez 4 animaux sur 30, le Bactério- age intestinal est dépourvu d'activité vis-à-vis du bacille patho- ne. Ces quatre animaux contractent la maladie dans les quatre urs qui suivent.

Dans les 26 échantillons, prélevés le 22 et ayant donné un résul- t positif, le Bactériophage présentait une activité relativement fai- le, 9 jours plus tard cette activité était beaucoup plus considérable

et à partir de ce moment l'épizootie cesse. Que s'est-il donc passé dans l'intervalle? La poule malade le 22 et qui résiste, présente à partir du 24 dans ses déjections un Bactériophage doué d'une activité considérable vis-à-vis du bacille pathogène.

Second exemple du même fait. Ferme M... à Véricourt (Aube) Poulailler de 25 poules L'épizootie débute pour la première fois en mai 1919 Le premier animal meurt le 18; le 19 je prélève au hasard 12 échantillons de déjections; 3 seulement renferment un Bactériophage d'activité faible vis-à-vis de *B. gallinarum*. 12 poules contractent la maladie du 19 au 26, 11 succombent; l'une, atteinte le 23, présente le 25 un Bactériophage fortement actif (+++) pour *B gallinarum* et guérit : à partir de ce moment l'épizootie cesse brusquement Le 27 je prélève au hasard 12 échantillons de déjections, dans tous existe un Bactériophage virulent pour le bacille pathogène (1++++; 9 +++; 2 ++).

Voici un troisième exemple, se rapportant à une paratyphose (1). Le 15 octobre j'isole *B. pfaffi* de deux échantillons de sang, prélevés sur des animaux morts dans un poulailler ou sévit depuis environ un mois une maladie présentant les caractères de la typhose.

De deux échantillons de déjections provenant d'animaux sains vivant dans le même poulailler j'isole, de l'un un Bactériophage doué d'une activité faible (+) pour *B pfaffi*, de l'autre un Bactériophage inactif pour ce bacille. Vers la fin du mois, trois poules atteintes guérissent à deux où trois jours d'intervalle puis l'épizootie cesse. J'examine alors six échantillons de déjections, tous renferment un Bactériophage d'une virulence forte (+++) vis-à-vis de *B. pfaffi*; vis-à-vis de *B. gallinarum* quatre restent inactifs, deux présentent une activité faible (+).

B pfaffi était bien en cause, car l'épizootie ayant repris trois mois plus tard, les 80 poules survivantes reçurent une injection sous-cutanée de 0,5 cm³ de culture du Bactériophage anti-pfaffi : l'épizootie cessa alors brusquement et définitivement à partir du moment de l'injection. On verra plus loin que cette cessation brusque est de règle à la suite de l'immunisation au moyen de cultures du Bactériophage.

Ces faits ne peuvent s'expliquer que d'une manière : une activité faible ou moyenne du Bactériophage intestinal vis-à-vis de la bacté-

(1) Expérience réalisée avec le concours de M. MICHEAU, médecin-vétérinaire à Trainel (Aube).

rie pathogène suffit pour placer l'animal à l'abri de la contagion : les bactéries pathogènes qui peuvent pénétrer dans l'intestin sont détruites avant tout début de pullulation Il n'en n'est pas de même une fois la maladie déclarée et l'organisme envahi l'animal ne guérit, ce qui est d'ailleurs rare dans la typhose, que grâce à une adaptation rapide du Bactériophage et à l'acquisition d'une virulence élevée qui lui permet d'effectuer une destruction intensive. Ce Bactériophage à virulence exaltée est répandu à profusion avec les déjections par l'animal convalescent et cela pendant plusieurs mois après sa guérison, comme nous l'avons vu plus haut, ce Bactériophage est nécessairement ingéré par les autres animaux de la basse-cour qui se trouvent du fait « contaminés » par un Bactériophage extrêmement actif et mis par là complètement à l'abri de la maladie malgré la présence de la bactérie pathogène dans le milieu extérieur et son ingestion fréquente, ingestion qui a pour effet de maintenir la virulence du Bactériophage.

Ces hypothèses ne sont pas une simple vue de l'esprit car l'interprétation que j'ai donnée des faits d'observation est confirmée par des expériences qui réalisent d'une manière schématique les conditions naturelles de l'épizootie. De plus on verra que le rôle de défense assigné au Bactériophage est confirmé par l'immunisation de plusieurs milliers d'animaux effectuée par l'administration de cultures du Bactériophage actif.

Avant de passer à l'exposition des expériences de contrôle, je ferai noter que, grâce à l'obligeance des vétérinaires de diverses régions envahies par la typhose, j'ai pu me procurer de nombreux échantillons de sang et de déjections de poules malades, mortes ou guéries provenant de onze foyers différents disséminés sur toute la France, ce qui m'a permis de vérifier la généralité des faits que j'avais personnellement observés.

Expériences de contrôle — Les expériences de contrôle ont été effectuées à Paris, c'est-à-dire en dehors de tout foyer épizootique.

Six poules, provenant d'une région indemne, sont mises en observation, les déjections sont journellement examinées pendant 10 jours dans le but de s'assurer de l'absence totale du Bactériophage actif contre *B. gallinarum*.

La poule 1 reçoit alors, *per os*, 1 cm³ d'une culture d'une souche de Bactériophage très actif vis-à-vis de *B. gallinarum* (++++).

La poule 2 reçoit 0,5 cm³ de la même culture par injection sous-cutanée.

Le lendemain un examen des déjection de ces deux animaux montre la présence d'un Bactériophage très actif vis-à-vis de *B gallinarum* . le Bactériophage passe donc dans l'intestin, qu'il soit ingéré ou inoculé. Le même fait à d'ailleurs été vérifié sur l'homme et sur divers animaux.

La poule 1 reçoit ensuite journellement *per os*, pendant 25 jours, 2 cm³ d'une culture de *B gallinarum* en bouillon : le Bactériophage actif persiste dans son intestin avec sa virulence première (++++) et s'y maintient jusqu'à neuf jours après la dernière dose de culture du bacille pathogène

Chez la poule 2, qui ne reçoit rien après l'inoculation de culture du Bactériophage actif, le Bactériophage intestinal cesse d'être virulent vis-à-vis du bacille en cause trois jours après l'injection. C'est-à-dire que chez la poule 1, soumise à des réinfections, le Bactériophage intestinal reste actif contre *B. gallinarum* pendant trente-quatre jours, chez la poule 2, non infectée, pendant trois jours.

Il s'ensuit que le Bactériophage intestinal ne reste actif que s'il peut se développer dans l'intestin aux dépens de cette bactérie, mais dans ce cas il reste actif aussi longtemps que cette condition se trouve remplie Inversement, la présence dans un intestin d'un Bactériophage doué de virulence vis-à-vis d'une bactérie donnée indique que cette bactérie s'est trouvée peu de temps auparavant dans l'intestin.

Au cours de l'expérience précédente, les poules 3 et 4 sont mises en contact avec la poule 1 ; elles boivent dans le même abreuvoir, mangent dans la même mangeoire, de plus on les change alternativement de cage de manière à réaliser une cohabitation analogue à celle du poulailler. Deux jours après le premier contact dans le cas de la poule 3, trois jours après pour la poule 4, je constate dans leurs déjections la présence d'un Bactériophage très virulent (++++) vis-à-vis de *B gallinarum*. A partir de ce moment elles reçoivent également chaque jour 2 cm³ d'une culture en bouillon de *B. gallinarum* et cela pendant 21 jours, elles ne sont à aucun moment incommodées. Le Bactériophage intestinal reste actif vis-à-vis de cette bactérie pendant tout le temps que dure l'administration du bacille pathogène et sept jours ensuite pour la poule 4, dix jours pour la poule 3. Le Bactériophage intestinal ne cesse pas pour cela d'être présent, car, de même que pour les poules 1 et 2, il reste actif vis-

à-vis de un ou de plusieurs des représentants du groupe Coli-Typhique-Dysentérique, seule la virulence vis-à-vis de *B. gallinarum* cesse de se manifester quand on cesse l'ingestion de cultures de ce dernier bacille.

L'expérience réalisée sur les poules 3 et 4 montre nettement que l'ultramicrobe Bactériophage est contagieux au même titre que la bactérie pathogène elle-même, puisque ces poules se sont « contaminées » au contact de la poule 1.

Les poules 5 et 6, qui n'ont pas été en contact avec les poules précédentes et que des examens répétés ont montré indemnes d'un Bactériophage actif pour *B. gallinarum*, reçoivent chacune *per os*, sur du pain, une dose unique de 2 cm³ de culture en bouillon de *B. gallinarum*. Trois jours après le repas infestant, la diarrhée se déclare et elles succombent 2 et 3 jours plus tard, après avoir présenté tous les symptômes de la maladie naturelle. La nécropsie montre la présence des mêmes lésions. L'ensemencement du sang donne des cultures pures de la bactérie pathogène qui se trouve également en abondance dans le contenu de l'intestin.

Les poules 1, 3, 4, qui ont résisté à des ingestions répétées de culture de *B. gallinarum* sans en ressentir le moindre trouble, étaient donc immunisées ; la première par suite de l'ingestion du Bactériophage actif contre la bactérie pathogène, les deux autres parce qu'elles ont été « contaminées » par ce Bactériophage par simple cohabitation avec la première.

Un mois environ après la disparition chez les poules 1, 2, 3, 4, de la virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis de *B. gallinarum*, je donne à chacune, pendant 3 jours, 2 cm³ d'une culture de ce bacille. Chez toutes, le Bactériophage intestinal manifeste de nouveau une virulence élevée vis-à-vis du bacille pathogène. Aucune ne manifeste le moindre trouble.

Dans toutes ces expériences les infestations ont toujours été faites avec des cultures en bouillon de *B. gallinarum* ensemencées directement avec du sang de poules mortes de la maladie naturelle, ce qui est indispensable par suite de la baisse de virulence de cette bactérie maintenue en culture.

Chez les poules 5 et 6, l'ingestion de culture du bacille pathogène a déterminé une attaque mortelle de typhose, le Bactériophage intestinal ne manifestant à aucun moment d'activité vis-à-vis du bacille en cause ; chez les poules 1, 2, 3, 4, au contraire, l'ingestion de la même culture ne provoque aucun trouble et leur Bactériophage

intestinal, qui avait cessé depuis environ un mois de manifester son activité vis-à-vis du bacille, récupère rapidement son activité première ; il n'avait donc pas disparu de l'intestin, seul son activité ne se manifestait plus mais il l'a récupéré rapidement du moment ou il s'est trouvé de nouveau en contact dans l'intestin avec la bactérie pathogène.

Cette « virulence latente » doit se maintenir pendant un temps très long : je rappellerai à ce propos le fait cité d'une souche du Bactériophage possédant encore après trois ans et plus de mille passages *in vitro*, toujours aux dépens du Bacille dysentérique de Shiga, le pouvoir d'attaquer les Bacilles coli et typhique, pouvoir faible, mais susceptible de s'exalter rapidement par passages aux dépens de ces bacilles. C'est précisément ce que l'expérience nous montre se produire *in vivo* chez la poule.

Une poule peut-elle contracter la typhose malgré la présence dans son intestin d'un Bactériophage actif? C'est certain. Comme nous l'avons vu à maintes reprises, la bactérie est susceptible de résistance vis-à-vis de l'action du Bactériophage et cette résistance est l'un des facteurs de la virulence d'une bactérie. Nous avons : d'un côté la bactérie qui, lors de l'introduction dans l'organisme peut être douée d'une résistance à l'action du Bactériophage allant de zéro à l'état réfractaire absolu ; d'un autre côté le Bactériophage qui, au même moment, peut posséder une virulence allant de zéro à une activité extrême ; l'infection se déclare ou ne se déclare pas suivant que la somme algébrique virulence + résistance est en faveur de l'un ou de l'autre des deux germes en présence. Une fois la maladie déclarée, la virulence de l'un et la résistance de l'autre s'exaltent où s'atténuent suivant que les circonstances du moment et les aptitudes acquises antérieurement favorisent l'un ou l'aûtre des deux germes : le sort de l'être au sein duquel se déroule la lutte, dépend de son issue.

Conclusions. — Les observations effectuées dans la maladie naturelle et les expériences qui confirment les déductions que ces observations suggèrent, montrent que l'ultramicrobe bactériophage existe toujours dans l'intestin de la poule, qu'elle soit saine ou malade, qu'elle vive en milieu indemne ou en milieu épizootique.

Vis-à-vis d'une bactérie déterminée, *B. gallinarum* en ce qui concerne la typhose aviaire, le Bactériophage intestinal peut être avirulent où virulent, et dans ce dernier cas sa virulence peut s'exer-

cer suivant une gamme qui va de l'activité à peine décelable à une activité extrême.

La virulence de l'ultramicrobe bactériophage pour *B. gallinarum* ne s'observe qu'en milieu contaminé. L'absence de virulence est également de règle chez les animaux malades qui doivent succomber et chez ceux qui ont succombé.

En milieu contaminé les animaux qui abritent dans leur intestin un Bactériophage doué d'une virulence suffisamment élevée vis-à-vis de la bactérie pathogène, se trouvent par ce fait même à l'abri de la maladie, et le restent tant que cette virulence actuelle ou latente se maintient assez élevée pour assurer la destruction rapide des bactéries pathogènes ingérées.

L'ingestion de bacilles pathogènes à intervalles suffisamment fréquents constitue le facteur principal du maintien de la virulence pour un bacille donné. Parmi les facteurs qui contribuent à diminuer où à faire disparaître la virulence du Bactériophage vis-à-vis de la bactérie pathogène, il faut placer en première ligne l'introduction dans l'organisme de bactéries douées de la résistance à l'action du Bactériophage ; nous avons nettement vu ce fait au cours de l'étude expérimentale du phénomène de la résistance des bactéries. Un autre facteur possible, influant sur l'activité du Bactériophage, c'est la réaction du milieu intestinal qui peut accidentellement varier suivant les conditions du moment : genre d'alimentation etc. . ; nous avons vu l'importance de la réaction du milieu sur la lyse *in vitro*.

Un Bactériophage qui a perdu sa virulence vis-à-vis de la bactérie pathogène faute de pouvoir l'exercer par suite de l'absence de cette bactérie, possède pourtant une virulence latente : placé de nouveau après un temps plus ou moins long en présence de la bactérie en cause, il peut récupérer la virulence première.

Le fait de la virulence habituelle du Bactériophage intestinal vis-à-vis de *B. gallinarum* dans les régions contaminées, indique la fréquence de l'ingestion de ces bacilles et partant l'extrême diffusion du bacille pathogène.

Dans les régions contaminées, l'animal chez qui le Bactériophage intestinal ne jouit pas d'activité vis-à-vis de *B. gallinarum*, contracte rapidement la maladie ; il résiste et guérit, ce qui est d'ailleurs l'exception, si le Bactériophage intestinal acquiert rapidement la virulence vis-à-vis du bacille pathogène ; il succombe dans le cas contraire.

Chez une poule qui guérit, le Bactériophage intestinal acquiert

ne virulence considérable vis-à-vis de la bactérie pathogène et la onserve pendant un temps très long, en fait aussi longtemps que le ıilieu extérieur reste infecté, et cela par suite de la fréquente ingesion de bacilles pathogènes, ce qui permet la culture du Bactériohage aux dépens de ce bacille, d'où le maintien de la virulence. let animal répand avec ses déjections ce Bactériophage à virulence xaltée, les animaux qui cohabitent avec lui sont « contaminés » et ar là-même se trouvent placés dans le même état de résistance que elui dont jouit l'animal guéri ; la guérison d'un animal dans une asse-cour marque souvent la fin de l'épizootie, ou son arrêt pendant uelques mois

L'étude d'une épizootie de typhose aviaire montre, en un mot, ue l'histoire de la contagion enregistre en dernière analyse l'hisɔire de la lutte entre deux agents, la bactérie pathogène et l'ultraıicrobe Bactériophage ; que ce dernier est transmissible d'individu individu : l'immunité est contagieuse au même titre que la malaie elle-même Le début d'une épizootie est marqué par la diffusion e la bactérie, la fin par la diffusion du Bactériophage virulent pour ɜtte bactérie. Nous allons retrouver les mêmes faits dans la septiɜmie hémorragique du buffle.

SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE DU BUFFLE (BARBONE) (1)

LE BARBONE. — Contrairement aux maladies précédentes, le barone ne présente pas de symptômes intestinaux ; c'est le type de ι septicémie hémorragique La bactérie pathogène est une pasteuɜlla, les cultures en bouillon de bœuf gardent leur virulence penant un temps considérable, au moins 18 mois : l'inoculation à un uffle ou à un bœuf de 1/5.000 de cm³ d'une telle culture virulente ɹe l'animal entre 36 et 40 h., avec tous les symptômes de la malaie naturelle ; à la nécropsie on trouve des lésions identiques, la ɔctérie pathogène fourmille dans le sang et les organes (2).

(1) Les expériences concernant le barbone ont été effectuées avec la collabotion de G LE LOUET, chef du Service Vétérinaire de la Cochinchine.

(2) J'ai vérifié à deux reprises différentes, que le sang dilué ou une macératɔn d'organes (foie et poumon) provenant de buffles morts de la maladie natulle, filtrés sur bougie Chamberland L2, inoculés à hautes doses au Buffle ou ι Bœuf, ne provoquent pas le plus léger malaise.

Le Buffle est par excellence la bête de trait pour la culture des rizières : il remplace le Bœuf dans toute l'Asie méridionale et les îles de la Sonde ; on l'utilise dans certaines régions de l'Italie, de l'Egypte, de la Hongrie et dans les Balkans. Partout où réside le Buffle on trouve le barbone, la plus terrible, sans doute, de toutes les maladies contagieuses : les traités indiquent une mortalité de 70 o/o à 95 o/o ; j'ai assisté à une épizootie qui a sévi en juin 1920 dans la province de Bac Lieu (Cochinchine), sur les 30.000 buffles de la région, 10 000 succombèrent et je n'ai pas eu l'occasion d'observer un seul animal ayant guéri ; le fait se produit mais il est très rare et la mortalité, en Indochine, dépasse certainement 99 o/o chez les animaux atteints.

La durée moyenne de l'évolution de la maladie est de 18 à 24 h., rarement 36 ; la mort survient parfois sans symptômes précurseurs : un animal attelé à une charrue s'arrête, reste quelques instants immobile, l'air hagard, puis tombe foudroyé.

Dans la forme ordinaire, que reproduit d'une manière parfaite la maladie expérimentale, l'animal est triste, le regard fixe, la tête basse ; la température monte rapidement à 41°5-42°5, la respiration, d'abord accélérée, devient râlante puis dyspnéique, les inspirations s'espacent de plus en plus ; l'animal présente du météorisme ; il se couche sur le sol en décubitus latéral complet, généralement peu de temps avant la mort, qui est précédée de crampes et parfois de quelques convulsions.

On observe souvent une tuméfaction qui apparaît généralement dans la région de la gorge et s'étend rapidement jusqu'à l'épaule ; l'engorgement est produit par un exsudat gélatineux de couleur jaune siégeant dans le tissu conjonctif. Parfois la tuméfaction se développe dans une autre partie du corps, elle peut être absente. Cette tuméfaction, comme le montre la maladie expérimentale, marque la porte d'entrée de la bactérie pathogène ; l'infection se réalise principalement par les voies digestives et le virus pénètre le plus souvent par l'arrière-gorge ; une tuméfaction sur une autre partie du corps, cuisse, ventre, croupe, indique au contraire une contamination par pénétration du virus au niveau d'une excoriation. L'examen du cadavre montre que l'absence de tuméfaction correspond à une contamination par voie stomacale ou intestinale.

Les races bovine et buffaline sont également sensibles, comme l'a d'ailleurs reconnu depuis longtemps Piot en Égypte. Les statistiques indochinoises indiquent, il est vrai, que la [illegible] par barbone est

très faible pour le Bœuf, mais cela tient uniquement au fait que cet animal ne vit guère dans les régions où sévit le barbone, régions extrêmement humides qui conviennent admirablement au Buffle animal semi-aquatique. Les rares bœufs qu'on trouve parfois dans de telles régions contractent d'ailleurs la maladie et succomben comme les buffles, après avoir présenté des symptômes identiques

L'influence des lieux bas et marécageux sur la contagion a été depuis un temps immémorial reconnu par les indigènes. Quand faire se peut, aussitôt qu'ils ont connaissance d'un cas de barbone dans le voisinage, ils s'empressent d'évacuer leurs animaux et de les conduire dans une région plus élevée. On sait d'ailleurs que les pasteurellas se conservent très longtemps virulentes dans la vase des marais et le limon des fleuves

Rôle du bactériophage. — En Cochinchine le barbone sévit continuellement à l'état sporadique, causant chaque année de nombreuses petites épizooties qui restent localisées à un village. Je citerai comme exemple une épizootie localisée que j'ai observée à Long Huu, village situé dans la province de Gocong.

Du 5 au 13 mai 1920, 17 buffles succombèrent : 5 mai, 1 mort le 7, 3 ; le 8, 2 ; le 9, 1 ; le 10, 2 ; le 11, 4 ; le 12, 3 ; le 13, 1 ; puis l'épizootie cesse, on ne constate plus un seul cas au cours des six mois suivants.

J'ai prélevé un échantillon des déjections de quatre des animaux atteints, soit avant la mort, soit sur le cadavre, aucun ne contenait un Bactériophage actif contre la bactérie du barbone.

Le 13 mai, je prélève les échantillons suivants de déjections provenant d'animaux sains :

1° d'un buffle, dans une étable où 2 sont morts, l'un le 12, l'autre le jour même ;

2° de 3 buffles dans une étable où un est mort le 5 mai ;

3° de 2 buffles dans une étable où 2 sont morts, l'un le 8, l'autr le 11 ;

4° de 4 buffles dans une étable indemne ;

5° de 1 buffle, vivant seul dans une étable située à 5 km. enviro du village de Long Huu ;

6° de 8 buffles dans des villages environnants, éloignés de 11 19 km.

De tous les échantillons 1, 2, 3, 4 j'isole un Bactériophage faible

ment ou moyennement actif (+ ou ++) pour la bactérie du barbone ; les échantillons 5 et 6 n'en renferment aucun.

Le 19 mai je prélève de nouveau des échantillons à Long Huu :

1° du buffle qui a fourni l'échantillon 1 du 13 mai ;

2° de 2 buffles vivant dans une étable où 3 sont morts du 7 au 12 mai

Ces échantillons donnent tous un Bactériophage moyennement virulent vis-à-vis de la bactérie du barbone (++).

Les animaux qui résistent présentent donc dans leur intestin un Bactériophage virulent pour la bactérie pathogène.

L'épizootie ne reste pas toujours localisée à un village, de temps à autre la maladie se propage rapidement de village à village et s'étend en quelques jours sur un vaste territoire. Il est rarement possible de déterminer le foyer primitif tant est grande la rapidité de diffusion. La mortalité devient alors considérable, les pertes se chiffrent souvent par centaines de mille, comme le fait s'est produit à maintes reprises en Chine, dans les Indes anglaise et néerlandaise ; parfois même, comme cela a eu lieu à Java, la race buffaline est pratiquement anéantie

Dans la première quinzaine de juin 1920 l'épizootie se généralisa dans la province de Bac Lieu et certaines parties limitrophes des provinces voisines (Cochinchine occidentale).

J'ai eu l'occasion d'examiner le sang de 11 animaux morts en des points disséminés sur toute l'étendue de la région envahie, dans tous les cas la bactérie du barbone s'y trouvait en quantité considérable (1).

L'épizootie s'éteignit dans la première quinzaine de juillet : elle avait duré un mois, tuant le tiers des animaux de la contrée.

La région de Thoi Binh fut particulièrement éprouvée, les pertes s'élevèrent à plus de 50 o/o des buffles présents dans les étables. Du 8 au 13 juillet, alors que l'épizootie cessait (le dernier buffle atteint mourut le 12), 20 prélèvements de déjections de buffles ayant

(1) Le diagnostic bactériologique est aisé, même si l'on n'a à sa disposition que du sang ou un fragment d'organe prélevé dans la brousse, sans aucune précaution, depuis quelques jours, ce qui est le cas habituel dans ces contrées. Il suffit d'effectuer un frottis sur la peau rasée d'un lapin avec le produit suspect, l'animal meurt dans les 24 h. et la bactérie du barbone se trouve en culture pure dans le sang du cœur, d'où il est facile de l'isoler. C'est également le procédé de choix pour vérifier la présence de la bactérie dans les déjections ou dans la vase.

résisté, sans d'ailleurs avoir présenté à aucun moment le plus léger symptôme, furent effectués dans des fermes du village de Thoi Binh et des hameaux voisins dans un rayon d'une quinzaine de kilomètres.

La recherche de la virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis de la bactérie du barbone, donna les résultats suivants :

Ferme	Mortalité	Dernier buffle mort le	Nombre de buffles ayant résisté	Virulence du bactériophage
Ngau 1	3	7 juillet	10	++
Ngau 2	—	—	—	1
Ngau 3	—	—	—	+++
Dê	2	10 juin	1	+
Doi 1	5	28 juin	4	++++
Doi 2	—	—	—	+++
Lanh	9	2 juillet	4	++
Tran	1	4 juillet	2	++++
Thé	3	11 juillet	1	++++
H v Chanh	2	2 juillet	2	++++
Hien	0	—	4	++++
Dû	0	—	6	+
Sam	2	2 juillet	8	++
P v Chanh	6	30 juin	8	++++
Cu	1	2 juillet	5	+++
So	3	6 juillet	5	++
No	5	30 juin	10	+++
Phuc	8	3 juillet	4	++++
Gia	8	29 juin	3	+++
Man	1	30 juin	3	++

Le Bactériophage intestinal est donc doué de virulence pour la bactérie du barbone chez tous les buffles que la maladie a épargnés.

Au cours de divers voyages à travers l'Indochine, j'ai prélevé 41 échantillons de déjections de buffles, chaque échantillon prove-

nant d'un village différent et où aucun buffle n'était mort depuis au moins deux ans ; dans trois seulement j'ai pu déceler la présence d'un Bactériophage présentant une activité, faible d'ailleurs (+), vis-à-vis de la bactérie du barbone ; le Bactériophage intestinal était pourtant présent dans tous, mais s'il était virulent pour l'une ou l'autre des bactéries intestinales, sa virulence était nulle pour la bactérie du barbone.

Nous venons de voir au contraire, qu'en région contaminée, au moment où l'épizootie cesse, le Bactériophage intestinal de tous les buffles qui ont échappé à la maladie est doué de virulence pour la bactérie, agent de l'épizootie. Nous retrouvons donc ici les mêmes faits que dans les maladies précédemment étudiées : la protection de l'organisme dans le cas du barbone, maladie septicémique, est assurée par le Bactériophage.

Le Bactériophage conserve très longtemps sa virulence pour la bactérie pathogène chez les buffles d'une région où a sévi la maladie, comme le montre l'exemple suivant.

En novembre 1919, une épizootie localisée de barbone sévit sur les buffles du village de Phuoc Thien (province de Bien Hoa). Dans une exploitation contenant 21 buffles, 7 succombèrent (2 adultes et 5 bufflons de un à deux ans). La maladie cessa, au dire du propriétaire, après que deux animaux eurent guéri coup sur coup.

Le 17 avril suivant, c'est-à-dire cinq mois plus tard, je prélève des échantillons de déjections de 8 des survivants : tous contiennent un Bactériophage virulent (6 ++, 2 +) vis-à-vis de la bactérie du barbone.

Je prélève également deux échantillons de boue dans un bourbier où les animaux ont coutume de rester enlisés jusqu'au cou pendant les heures les plus chaudes de la journée, des deux échantillons j'isole un Bactériophage virulent (++) pour la bactérie du barbone. La destruction des bactéries pathogènes dans le milieu extérieur doit souvent s'effectuer par le Bactériophage, car il est certain que si des bactéries du barbone avaient été introduites par un animal malade dans ce bourbier, le Bactériophage présent les aurait détruites. D'un autre côté ce fait nous montre un des modes de « contagion » du Bactériophage actif : un seul buffle dans l'intestin duquel le Bactériophage a acquis la virulence pour la bactérie pathogène suffit pour « contaminer » tout le troupeau qui fréquente le bourbier.

Les épizooties localisées sont de courte durée, malgré cela nous

voyons que la bactérie pathogène persiste pendant des mois dans le milieu extérieur et que son ingestion par les buffles est fréquente puisque la virulence du Bactériophage se conserve vis-à-vis de cette bactérie, la permanence de l'ingestion d'une bactérie est, comme nous l'avons vu, une condition de la permanence de la virulence du Bactériophage vis-à-vis de cette bactérie. L'épizootie cesse, non pas par suite de l'absence de bactéries pathogènes, mais par suite de la présence du Bactériophage virulent dans l'intestin de tous les animaux exposés

Toutes les observations sont donc semblables, qu'il s'agisse de la typhose aviaire ou du barbone du buffle, et j'ai pourtant recherché à dessein des épizooties de nature très différente pour avoir plus de certitude quant au rôle général du Bactériophage dans l'immunité.

On pourrait s'étonner au premier abord que le Bactériophage intestinal, dont le rôle se conçoit aisément dans le cas de maladies à manifestations intestinales, constitue une défense de l'organisme dans le cas de septicémies. En réalité, quelle que soit la maladie, la bactérie pathogène passe toujours dans l'intestin. Prenons le cas d'une maladie localisée, la méningite cérébro-spinale, par exemple : nous savons que le symptôme primaire est une rhino-pharyngite et que même les sujets sains qui ont été en contact avec un malade portent souvent le germe spécifique dans l'arrière-gorge ; il est hors de doute que bon nombre des méningocoques présents dans le rhino-pharynx sont régurgités et passent dans l'intestin. Il est inutile d'insister, à part quelques rares exceptions sur lesquelles nous reviendrons, quelle que soit la maladie considérée, la porte d'entrée du virus est soit la voie buccale soit la voie respiratoire, dans l'un ou l'autre cas l'ingestion de germes est pour ainsi dire obligatoire ; la bactérie pathogène se trouve toujours à un moment donné en contact avec le Bactériophage intestinal qui est alors à même de s'accoutumer à la bactériophagie vis-à-vis de cette bactérie, d'acquérir en un mot la virulence.

Dans le cas particulier du barbone, la bactérie pathogène se trouve abondamment disséminée dans le milieu extérieur en région contaminée. J'ai réussi, à deux reprises différentes, à l'isoler en milieu épizootique de la boue d'un marais où des buffles avaient coutume de s'enfouir : le fait est d'ailleurs naturel puisqu'on trouve la bactérie du barbone dans l'intestin des animaux malades ou qui ont succombé. L'ingestion de la bactérie pathogène est nécessairement fréquente par des animaux qui sont plongés pendant des heures entières

dans une boue qui renferme cette bactérie. Si l'animal qui l'ingère présente une érosion sur un point quelconque des voies digestives, il est susceptible de se contaminer ; sinon les bactéries passent dans l'intestin où elles se trouvent à portée des ultramicrobes bactériophages qui peuvent alors acquérir la virulence vis-à-vis de cette bactérie ; si le fait se produit, l'animal se trouve désormais à l'abri de la contagion et sert de vecteur du Bactériophage. Un animal malade propage la maladie, un animal en état de résistance active propage l'immunité.

PESTE BUBONIQUE

Faute de circonstances favorables, je n'ai pas pu suivre l'évolution du Bactériophage intestinal chez l'Homme atteint de peste ; les quelques cas que j'ai pu suivre ont tous été mortels, à aucun moment le Bactériophage intestinal n'a montré la moindre virulence vis-à-vis du Bacille pesteux, son activité est restée limitée au *B. coli*

J'ai pu me procurer des échantillons de déjections de deux individus convalescents, prélevés six et onze jours après le début de la convalescence, suivant le médecin traitant. J'ai isolé, dans le premier cas, un Bactériophage doué d'une virulence moyenne (++), dans le second d'une virulence faible (+), vis-à-vis du Bacille pesteux. J'ai pu exalter, *in vitro*, la virulence du premier et le conserver en culture.

D'un autre côté j'ai recherché la présence d'un Bactériophage actif contre ce bacille dans les déjections de vingt-deux indigènes vivants dans des régions indemnes de peste, dans aucun cas je n'ai pu en isoler D'ailleurs, vu le mode particulier de contamination dans la peste bubonique, l'étude de la propagation chez l'homme n'offre qu'un intérêt secondaire, au point de vue des recherches épidémiologiques. Nous savons qu'une épidémie de peste n'est que la conséquence d'une épizootie murine ; ce qui est intéressant à étudier, c'est donc l'épizootie, cause première de l'épidémie. Pour arriver à un résultat il faut toujours suivre l'ordre naturel des choses : au point de vue humain l'épidémie est évidemment le fait important, au point de vue naturel, ce n'est qu'un incident secondaire,

mais si nous pouvions supprimer l'épizootie, l'épidémie cesserait d'elle-même.

De ce que nous connaissons actuellement sur l'épidémiologie de la peste, il résulte que tous les rats, vivants dans une ville où ont eu lieu quelque temps auparavant des cas de peste humaine, sont des animaux qui ont résisté à la contagion, soit qu'ils aient été atteints et qu'ils aient guéri, soit qu'ils soient restés indemnes. J'ai donc recherché la présence de la virulence du Bactériophage intestinal du rat vis-à-vis du Bacille de la peste.

1° 21 échantillons d'excréments de rats provenant de villages indochinois exempts de peste, n'ont donné aucun résultat : le Bactériophage intestinal s'y trouvait, actif contre l'une ou l'autre des bactéries intestinales, mais ne possédait aucune virulence vis-à-vis du Bacille pesteux.

2° Une petite épidémie de peste (11 cas mortels), eut lieu dans la ville de Bac Lieu, à l'orient de la Cochinchine, dans le courant de juillet 1920. Le 6 novembre suivant je fais prélever dans cette ville quatre échantillons d'excréments de rats, chaque échantillon étant composé de quelques douzaines de crottes provenant certainement de plusieurs individus. La recherche de la virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis du Bacille pesteux donna les résultats suivants :

Prélèvement	dans un grenier à paddy	++
—	sur le quai d'embarquement	+++
—	dans une décortiquerie	+++
—	dans une maison indigène	++++

Les rats ayant survécu à l'épizootie abritaient donc dans leur intestin un Bactériophage doué d'une grande virulence pour le Bacille pesteux.

La peste sévit à l'état sporadique dans la région de Phantiet, Annam méridional, depuis une vingtaine d'années. Je fis prélever des échantillons d'excréments de rats dans les villages contaminés, chaque échantillon étant formé par la réunion de crottes provenant de divers animaux. Voici le résultat de la recherche de la virulence du Bactériophage intestinal contenu dans ces excréments vis-à-vis du Bacille pesteux.

Village de	Thien Duc	++
—	Hung Long	+
—	Duc Hang	+++

Village de	Duc Thang	++
—	Tri Long	++
—	Phu Tay	+++
—	Cu Long	+

Les résultats sont donc identiques à ceux de Bac Lieu, quoique a virulence semble être moins élevée, ce qui n'a d'ailleurs qu'une mportance relative dans le cas présent ; chaque échantillon étant omposé d'excréments provenant de plusieurs rats, les résultats ndiqués ne représentent qu'une moyenne.

Le Bactériophage est-il présent chez tous les rats dans une région ontaminée, ou seulement chez un certain nombre ? J'ai prélevé à hantiet les excréments de six jeunes rats, d'après leur taille âgés le trois ou quatre semaines, et j'en ai fait l'examen : quatre contenaient un Bactériophage doué de virulence pour le Bacille pesteux +), deux ne le contenaient pas. Ces derniers animaux étaient donc usceptibles de contracter la peste.

On peut conclure des résultats ci-dessus que, de même que pour a typhose aviaire et le barbone, la cause de la résistance vis-à-vis lu Bacille pesteux est due à la présence dans l'organisme d'un Bactériophage doué de virulence pour ce bacille.

Comment l'accoutumance du Bactériophage intestinal peut-elle 'effectuer dans le cas du Bacille pesteux ? On a signalé à diverses eprises la présence de ce bacille dans l'intestin des pesteux, ils sont lonc susceptibles de se répandre dans le milieu extérieur et d'être ngérés ; les cadavres des rats morts constituent une autre cause de lissémination : ces cadavres sont souvent dévorés par les rats survivants ce qui contribue, chez ceux qui résistent, à entretenir la irulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis de la bactérie pathogène. D'autre part les observations et les expériences directes nous ont montré que le Bactériophage ne possède la virulence actuelle is-à-vis d'une bactérie que si les ingestions de cette bactérie sont réquentes, la permanence de la virulence du Bactériophage intestinal du rat vis-à-vis du Bacille pesteux indique la persistance de ce acille dans le milieu extérieur, plusieurs mois après que le dernier as humain a eu lieu. D'ailleurs, la reviviscence de l'épidémie chaque année dans certaines localités, Bac Lieu par exemple, montre bien qu'il ne peut en être autrement (1).

(1) La constatation de la présence chez les [illegible]

FLACHERIE

Les quelques recherches effectuées n'avaient d'autre but que de vérifier si chez les invertébrés la défense de l'organisme était également assurée par le Bactériophage.

Dans un élevage en Cochinchine, un certain nombre de vers à soie succombaient par suite d'une maladie présentant tous les caractères de la flacherie. L'examen des déjections des malades, ainsi que des cadavres, montrait la présence d'un coccobacille, gram négatif, qui n'existait pas dans les déjections des vers sains. L'ingestion, sur des feuilles de mûrier de culture de ce coccobacille, reproduisait la maladie (11 vers sur 12 succombèrent de 6 à 11 jours après le repas infestant)

J'ai préparé trois filtrats avec les déjections de vers sains vivants dans les corbeilles où se trouvaient des vers flats : ces trois filtrats contenaient un Bactériophage doué d'une virulence moyenne ou forte (++, +++, +++) vis-à-vis du coccobacille. D'autre part deux filtrats préparés, l'un avec le contenu intestinal de vers malades, l'autre avec le contenu intestinal de vers morts flats, ne renfermaient pas de Bactériophage actif vis-à-vis de cette bactérie.

Je n'ai pas poussé plus loin ces recherches, le but que je m'étais fixé était atteint : elles suffisent pour montrer que les mêmes faits observés dans les maladies infectieuses des mammifères se retrouvent dans une maladie d'un invertébré Il semble donc logique de considérer que la défense de l'organisme par le Bactériophage doit constituer un fait général dans toute la série animale.

Bactériophage actif vis-à-vis du Bacille pesteux pourrait dans certains cas être utile car elle indique la présence de ce bacille dans le milieu extérieur et la possibilité d'une reprise de l'épidémie Cette constatation peut encore être utile pour l'établissement d'un diagnostic rétrospectif inexistant ou douteux : supposons que quelques morts suspectes soient survenues dans une agglomération un certain temps auparavant, la présence chez les rats d'un Bactériophage doué de virulence pour le Bacille pesteux lève tous les doutes, il s'agissait de peste Le cas suivant peut encore se présenter : on a signalé quelque temps auparavant une mortalité murine, s'agissait-il d'une épizootie pesteuse ? La réponse peut être donnée par la constatation de la virulence du Bactériophage du rat vis-à-vis du bacille spécifique.

CONCLUSIONS

Bornons-nous pour l'instant aux conclusions suivantes.

Quelle que soit la maladie considérée, le tableau reste le même : une bactérie pathogène s'introduit dans un organisme, deux cas peuvent tout d'abord se présenter :

1° Le Bactériophage intestinal manifeste de suite son activité vis-à-vis de la bactérie, celle-ci est détruite avant tout développement, la maladie ne se déclare pas ;

2° Le Bactériophage intestinal reste inactif, la bactérie se développe, la maladie se déclare.

La lutte peut se produire au cours de la maladie : le Bactériophage au contact de la bactérie pathogène acquiert la virulence, la bactérie de son côté est susceptible d'acquérir la résistance, et les péripéties de cette lutte sont fidèlement enregistrées par l'état du malade. La convalescence commence du moment où la virulence du Bactériophage est suffisante pour lui permettre de prendre définitivement le dessus.

L'issue de la maladie est fatale si le Bactériophage est inactif par suite de circonstances intestinales défavorables ou si la bactérie parvient à acquérir l'état réfractaire. Ce dernier cas paraît être de beaucoup le moins fréquent, du moins en ce qui concerne les maladies étudiées.

Dans l'épidémie nous retrouvons la reproduction en grand dans une communauté d'individus, de la lutte entre l'ultramicrobe et une bactérie.

L'ultramicrobe bactériophage est transmissible d'individus à individus, tout comme la bactérie elle-même. L'histoire de l'épidémie est en dernière analyse l'histoire de la contagion des deux microorganismes : l'épidémie cesse du moment où tous les individus sensibles abritent dans leur organisme un Bactériophage actif contre la bactérie agent de l'épidémie considérée, soit que le Bactériophage ait acquis la virulence dans l'organisme même de l'individu qui l'abrite, soit que cet individu ait été « contaminé » par un Bactériophage ayant acquis la virulence dans l'organisme d'un autre individu.

CHAPITRE II

LE BACTÉRIOPHAGE CHEZ L'INDIVIDU SAIN

Le Bactériophage chez l'Homme. Le Bactériophage chez le Cheval. Le Bactériophage chez la Poule. Le Bactériophage chez divers animaux. Conclusions.

Les recherches effectuées sur le malade et sur l'individu sain exposé à la contagion, nous ont montré que la résistance à l'agent infectieux s'accompagne de la présence dans l'intestin d'un ultramicrobe bactériophage doué de virulence vis-à-vis de la bactérie pathogène en cause. D'autre part, comme je l'ai montré dans la première partie de cet ouvrage, il n'existe qu'une seule espèce de Bactériophage, susceptible, par accoutumance, d'acquérir la virulence vis-à-vis des diverses bactéries qu'il attaque (1).

Une question se pose : ce Bactériophage qui acquiert la virulence vis-à-vis de diverses bactéries pathogènes, fait-il son apparition au moment où sa présence est précisément nécessaire, ou bien est-ce un hôte normal de l'intestin ? L'examen des déjections de nombreux individus appartenant aux espèces les plus variées permet de trancher la question.

LE BACTÉRIOPHAGE CHEZ L'HOMME SAIN

J'ai suivi les variations de la virulence du Bactériophage intestinal chez un homme sain. A cet effet, dans une première série d'ex-

(1) La possibilité pour un germe d'être virulent pour de très nombreuses espèces d'êtres n'est pas une exception particulière au Bactériophage : il suffit de citer le Bacille tuberculeux auquel bien peu d'animaux sont insensibles.

périences, j'ai prélevé chaque quinze jours un échantillon de déjections; j'ai limité la recherche de l'activité du Bactériophage aux espèces suivantes : *B. coli*, bacilles dysentériques, types Shiga, Flexner et Hiss, bacilles typhique et paratyphiques A et B, et éventuellement certaines autres bactéries présentant un intérêt particulier.

Lors d'un premier examen, une activité faible (+), surtout vis-à-vis du *B. coli*, était passée inaperçue ou restait douteuse; ayant repris les filtrats après quelques mois, une technique moins imparfaite m'a permis cette fois d'en constater nettement la présence. Comme on le verra par la lecture du tableau où sont consignés les résultats, quelques-uns des examens sont restés négatifs : le Bactériophage semble absent. Le résultat aurait-il été le même s'il avait été possible de faire agir le filtrat sur toutes les bactéries susceptibles de se trouver dans l'intestin? J'ai voulu le vérifier l'échantillon du 1er juillet étant resté inactif vis-à-vis des huit espèces bactériennes essayées systématiquement, je l'ai fait agir sur une série de bactéries diverses prises au hasard; il s'est montré doué d'une forte activité vis-à-vis d'une salmonella (hog choléra). Répétition du même fait et même recherche le 1er décembre : cette fois le filtrat s'est montré actif vis-à-vis de *B. enteritidis*.

Ces deux exemples suffisent pour montrer que l'absence du Bactériophage n'est qu'apparente. Nous devons prendre en considération qu'on ne peut reconnaître l'activité du Bactériophage, et par conséquent sa présence, qu'en faisant agir le filtrat sur une culture de la bactérie vis-à-vis de laquelle il est précisément actif; d'un autre côté il n'est pas possible de faire porter l'examen sur l'ensemble de toutes les bactéries susceptibles de se trouver ordinairement ou occasionnellement dans l'intestin, et cela pour plusieurs raisons : d'abord à cause de leur nombre, car il n'est pas une espèce bactérienne connue ou encore inconnue qu'il ne soit possible d'y trouver à un moment donné. Nous avons vu de plus que certaines espèces bactériennes ne sont pas « homogènes » vis-à-vis du Bactériophage, *B. coli* est de ce nombre, certaines souches sont attaquées alors que d'autres restent indemnes : il faudrait donc faire porter l'examen sur toutes les variétés des diverses espèces, nouvelle impossibilité. On sait enfin qu'il existe dans l'intestin certaines bactéries observables au microscope, qu'il n'est pas possible d'isoler et d'obtenir en culture : le Bactériophage ne vit-il pas en commensalité avec ces bactéries avec lesquelles il formerait dans l'intestin des

TABLEAU I

Date	Virulence du Bactériophage intestinal vis-à-vis de							
	B. coli	Bacille dysentérique			Bacille			Divers
		SHIGA	FLEXNER	HISS	Typhique	Para A	Para B.	
15 1	0	0	0	0	0	0	0	
1 2	+	0	0	0	0	0	0	
15 2	0	0	0	0	0	0	0	
1 3	0	0	0	0	0	0	+++	
15 3	+	0	0	0	0	0	0	
1.4	+	0	0	0	0	0	0	
15 4	+++	0	0	0	0	0	0	
1 5	+	0	0	0	0	0	++	
15 5	+	0	0	0	0	0	0	
1.6	0	0	0	0	0	0	0	
15 6	+	0	++	+++	0	0	0	*Salmonella* +++
1 7	0	0	0	0	0	0	0	
15 7	+++	0	0	0	0	0	0	
1 8	+	+	0	0	0	0	0	
15 8	+++	+++	0	0	0	0	0	
1 9	+++	0	0	0	0	0	0	
15 9	+	+++	0	0	0	0	0	
1 10	+	0	0	0	0	0	+++	
15 10	+	+++	++	0	0	0	0	
1 11	+	0	0	0	0	0	0	
15 11	+	0	0	0	0	++	0	*B. enteritidis* ++
1 12	0	0	0	0	0	0	0	
15 12	+	0	0	0	0	0	0	

« cultures mixtes » ? Il peut même se faire que l'impossibilité de l'isolement de ces bactéries soit précisément dûe à ce phénomène de commensalité, car nous avons vu que la gélose sur laquelle on repi-

ue les cultures mixtes reste parfois vierge de colonies bacté-iennes.

Quoiqu'il en soit, voici le tableau donnant le résultat des recher-ies effectuées sur l'homme normal en question, elles suffisent à iontrer que le Bactériophage est un hôte normal de l'intestin l'ableau I).

Au cours de cette même année cet homme présenta à deux repri-'s différentes, le 3 juillet et le 26 septembre, de très légers trou-les intestinaux d'une durée de quelques heures; la première fois ms cause apparente, la seconde à la suite d'un repas suspect pris ms une auberge de village. J'ai chaque fois prélevé des échantil-ns des selles les jours suivants et y ai recherché l'activité du Bac-riophage; voici les résultats obtenus (Tableau II).

TABLEAU II

Date	B coli	Bacille dysentérique			Bacille		
		SHIGA	FLEXNER	HISS	Typhique	Para A	Para B
4.7	+++	o	+++	++	o	o	o
5.7	++	+	+++	+	o	o	o
6 7	+++	+	++	+	o	o	o
7.7	++	o	++	o	o	o	o
8 7	+	o	o	o	o	o	o
27 9	+++	++	+	+	+	o	++++
28.9	+++	+	o	o	o	o	++++
29 9	+++	o	o	o	o	o	++
30.9	++	o	o	o	o	o	+++
1.10	+	o	o	o	o	o	+++
2.10	+	o	o	o	o	o	+
3.10	+	o	o	o	o	o	o

Aucun doute que dans le premier cas le Bacille dysentérique de ·EXNER ait été en cause, le Bacille paratyphique B dans le second. y a eu maladie avortée, le Bactériophage ayant rapidement acquis virulence vis-à-vis du germe envahisseur.

Terminons ce paragraphe en donnant le résultat d'examens pratiqués sur les selles de trois personnes normales (39, 22 et 17 ans) effectués du 15 au 30 juillet. Je n'indiquerai que les bactéries vis-à-vis desquelles existait la virulence du Bactériophage pour chacune de ces trois personnes désignées sous les numéros I, II, III (Tableau III).

TABLEAU III

(C = *B. coli*; H = B. dysentérique de Hiss; Sh. = B. dysentérique Shiga
B = B. paratyphique B.).

Date	I	II	III
15.7	C +	C +++	0
16.7	C +	C +++	C +++
17.7	0	C +	0
18.7	C +++ H +++	0	0
19.7	C +++ H ++	0	C ++ B +
20.7	C ++ H +++	0	C + B +
21.7	C ++ H +	C +	0
22.7	0	0	0
23.7	0	0	C +
24.7	C +++	0	0
25.7	C ++	0	0
26.7	0	0	0
27.7	C ++ Sh. +++	C ++	C +++
28.7	C + Sh +	0	0
29.7	0	C +	0
30.7	C +	C +	0

Il est inutile, je crois, de multiplier les exemples; toutes les expériences effectuées se ressemblent. Une conclusion s'impose : le Bactériophage est l'hôte normal de l'intestin de l'homme.

LE BACTÉRIOPHAGE CHEZ LE CHEVAL

J'ai examiné 62 échantillons de crottin provenant de chevaux vivant dans des villes ou à la campagne, en France ou en Indochine, tous renfermaient un Bactériophage actif. Voici la liste des animaux examinés, les résultats figurent au tableau IV.

1. Cheval 21 de l'Institut Pasteur, fournisseur de sérum antidysentérique, trois jours après une injection de toxine (Shiga).
2. Même cheval, 10 jours plus tard.
3. Même cheval, 4 mois plus tard, 48 h. après une injection de toxine.
4. Cheval 114, fournisseur de sérum antidysentérique (Shiga).
5. Cheval 18, fournisseur de sérum antidysentérique (Shiga).
6. Même cheval 4 mois plus tard, 48 h. après une injection de toxine.
7. Cheval 64, reçoit depuis deux ans des injections de bacilles dysentériques atoxiques (Flexner et Hiss).
8. Cheval 65, reçoit depuis deux ans des injections de bacilles dysentériques atoxiques (Flexner et Hiss).
9. Cheval 68, reçoit depuis deux ans des injections de bacilles dysentériques atoxiques (Flexner et Hiss).
10. Cheval recevant des injections de bactéridie charbonneuse.
11. Cheval recevant des injections de bactéridie charbonneuse.
12. Cheval de voiture à Paris.
13. Cheval de voiture à Paris.
14. Cheval de voiture à Paris.
15. Même que le précédent, quatre jours plus tard.
16. Cheval de ferme dans une exploitation où sévit la typhose viaire.
17. Cheval de ferme dans une exploitation où sévit la typhose viaire.
18. Cheval de ferme dans une exploitation où sévit la typhose viaire.
19. Cheval de course, Chantilly.
20. Cheval de course, Chantilly.
21. Même que 19, huit jours après.

22. Même que 20, huit jours après.
23. Cheval de voiture à Saïgon.
24. Cheval de voiture à Saigon.
25. Cheval de selle à Nha-Trang (Annam).
26. Cheval de selle à Phantiet (Annam).

Il est inutile de multiplier les résultats : les 36 autres échantillons ont donné des résultats en tout semblables.

J'ai en outre recherché pour les chevaux 19 et 20, si le Bactériophage présentait une virulence pour diverses autres bactéries, entre autres pour les bacilles suivants :

1. Coccobacille (?) isolé du mucus nasal d'un cheval de la même écurie ayant présenté l'avant-veille une élévation de température :

cheval 19 ++ cheval 20 0

2. Un coccobacille isolé par CÉSARI du sang d'un cheval abattu aux abattoires de Vaugirard :

cheval 19 + cheval 20 ++

3. Salmonella (hog choléra) :

cheval 19 ++ cheval 20 ++

4. *B. enteritidis* :

cheval 19 0 cheval 20 +

Ces résultats montrent que la virulence du Bactériophage s'étend au même moment à un très grand nombre de bactéries.

A noter que chez les chevaux 16, 17 et 18 qui vivaient dans un milieu contaminé par *B. gallinarum*, et chez ceux-la seuls, le Bactériophage intestinal présentait une certaine virulence vis-à-vis de cette bactérie.

J'ai examiné 23 échantillons de sérum, de caillot restant après la décantation du sérum, de la couche leucocytaire surmontant ce caillot, provenant de chevaux abritant dans leur intestin un Bactériophage actif vis-à-vis du Bacille dysentérique; dans aucun cas je n'ai pu constater sa présence dans le sang. Dans tous les cas la prise de sang avait été faite une quinzaine de jours après la dernière injection de toxine ou de bacilles (tous les échantillons de sang examinés provenaient de chevaux fournisseurs de sérum antidysentérique) ; il y aurait lieu de vérifier si le passage du Bactério-

TABLEAU IV

Cheval	*B. coli*	Bacille dysentérique			Bacille			*B. gallinarum*
		SHIGA	FLEXNER	HISS	Typhique	Para A	Para B	
1	++	++++	++	++	0	0	0	—
2	+	+	+	0	0	0	0	—
3	+	++	0	0	++	+	+	—
4	++	++	+	+	0	+	++	0
5	++	+++	+++	+++	0	0	0	0
6	+	0	+++	+++	0	0	0	0
7	++	++++	++++	++	0	0	0	—
8	++	+	++++	++++	0	0	0	—
9	++	++++	++	++	0	0	0	—
10	++	0	++	++	0	0	+	—
11	+	0	+	++	0	0	0	0
12	++	+++	+	++	0	0	+	0
13	++	++	++	+	+	0	0	0
14	++	++++	++	++	0	0	0	0
15	0	++++	++	+++	0	0	0	0
16	++	++++	++++	++++	++	+++	++	++
17	++	+++	++	++	+	++	0	++
18	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
19	++	++++	+	+	0	0	++	0
20	0	++	0	0	0	0	0	0
21	+	+	+	0	0	+	++	0
22	++	0	0	0	0	0	++	0
23	++	+++	++	++	0	0	++	0
24	+	++++	+++	++	++	0	+	0
25	+	++	0	0	0	0	0	0
26	+++	+++	++	++	0	0	+++	0

hage dans la circulation ne se fait pas à un moment rapproché de
injection, surtout quand il s'agit de bactéries vivantes. J'ai en effet

indiqué précédemment que j'avais observé le passage du Bactériophage intestinal dans la circulation, chez le rat et chez la poule, à la faveur d'une septicémie. En tout cas la constatation de la présence pour ainsi dire constante dans les excréments du cheval d'un Bactériophage actif vis-à-vis du Bacille de SHIGA, et l'absence de ce Bactériophage dans le sang, montre d'une manière irréfutable que l'intestin est l'unique endroit où se cultive normalement le Bactériophage. Ce seul fait suffirait à démontrer l'erreur de la conception de BORDET qui a émis l'hypothèse que le Bactériophage était d'origine leucocytaire.

LE BACTÉRIOPHAGE CHEZ LA POULE

J'ai effectué 70 examens de déjections de poules en vérifiant la virulence du Bactériophage sur les huit bactéries choisies comme test, je crois inutile de fournir tous les résultats d'autant plus qu'ils sont tous de même nature, je donnerai seulement comme exemple les résultats de un ou de deux examens dans chaque lot (Tableau V).

1 et 2, poules vivant en France dans des régions indemnes de typhose aviaire (12 échantillons examinés);

3 et 4, poules saines vivant dans des régions où sévissait la typhose aviaire (19 autres examens, portant sur les huit bactéries test, donnent des résultats comparables, notamment en ce qui concerne la virulence pour *B. gallinarum*);

5 et 6, poules guéries de typhose aviaire (4 examens);

7 et 8, poules mortes de typhose aviaire (8 autres examens donnent des résultats comparables : le Bactériophage est présent mais ne possède aucune virulence pour le bacille pathogène),

9 et 10, poules vivant en Cochinchine dans des régions indemnes de typhose aviaire et de barbone;

11 et 12, poules vivant en Cochinchine dans des régions ou sévissait le barbone mais indemnes de typhose aviaire (11 examens tous comparables);

13 et 14, j'ajoute à ce tableau le résultat de deux examens de déjections d'oies vivant en France dans des régions où sévissait la typhose aviaire (1).

(1) Je recommanderais aux bactériologues qui désireraient se procurer des souches de Bactériophage, de s'adresser principalement aux déjections de che-

TABLEAU V

N°	*B. coli*	Bacille dysentérique			Bacilles			*B. gallinarum*	Bact barbone
		SHIGA	FLEXNER	HISS	Typhique	Para A.	Para B		
1	o	o	+	+++	o	o	o	o	—
2	++	++	o	o	+	o	+	o	—
3	+	+++	+++	+++	+	+	++	++	—
4	++	+	+	++	++	o	+	+	—
5	+++	++++	+++	+++	++	++	++	++++	—
6	++	+++	+++	+++	o	+	+++	+++	—
7	+	++	o	o	o	o	++	o	—
8	o	o	++	+	o	o	+	o	—
9	++	+++	+	++	o	o	o	o	o
10	+	+	o	+++	o	o	++	o	o
11	++	+++	++	++	o	o	++	o	+
12	o	+	o	+	++	+	++	o	++
13	+++	++++	+++	+++	+	++	++	++	—
14	++	++	++	++++	o	o	+++	++	—

ANIMAUX DIVERS

J'ai examiné des échantillons de déjections des animaux suivants : (Tableau VI).

1, singe vivant en cage à Paris ;

2 et 3, chats vivant à Paris ;

4 et 5, bœufs vivant dans une ferme où sévissait la typhose aviaire ;

vaux ou de poules, surtout au début de leurs recherches : c'est chez ces animaux que l'on peut en effet isoler le plus facilement des souches très actives dès leur sortie de l'organisme, ces déjections sont, de plus, plus aisées à se procurer que les déjections de convalescents.

Tableau VI

N°	*B coli*	Bacille dysentérique — Shiga	Bacille dysentérique — Flexner	Bacille dysentérique — Hiss	Bacille — Typhique	Bacille — Para A.	Bacille — Para B	Bact bar-bone	*B gallinarum*
1	+	++	o	o	o	o	o	—	—
2	o	+	++	+	o	o	o	—	—
3	+	o	+	+	o	o	o	—	—
4	o	o	o	+++	o	o	o	—	+
5	++	++	+	+	o	o	o	—	++
6	+	++	++	o	o	o	o	—	o
7	o	++	o	o	o	o	o	—	o
8	++	+++	++	+	o	o	++	—	o
9	+	o	+	o	o	o	o	—	o
10	+	++++	++	o	o	o	o	o	—
11	++	o	+++	o	o	o	o	o	—
12	+++	+	o	o	o	o	o	++	—
13	+++	++	++	o	o	o	o	+++	—
14	++	+++	++	o	o	o	+	o	—
15	+++	+	+	o	o	o	o	o	—
16	+	+++	o	+	o	o	+	+	o
17	++	+	o	o	o	o	o	+	o
18	+	o	o	o	+	o	++	—	o
19	+	++	o	+	o	o	o	—	o
20	++	++	+++	+++	o	o	+++	—	++
21	+++	+	o	+	+	+	++	—	+
22	+	++	+	+++	o	o	o	—	—
23	o	+	o	o	o	o	o	—	—
24	++	o	+	o	o	o	o	—	—
25	++	o	o	o	o	o	o	—	—

6 et 7, bœufs vivant en France dans une région indemne de maladies épizootiques ;

8 et 9, taurillons vivant en Cochinchine dans des régions indemnes d'épizooties (42 autres examens comparables).

10 et 11, buffles vivant dans des régions indemnes de barbone (14 autres examens comparables);

12 et 13, buffles sains vivant dans des régions où sévissait le barbone (24 autres examens comparables);

14 et 15 (à titre de comparaison), buffles malade (14) ou mort (15) de barbone; huit autres examens ont été effectués, cinq étaient comparables à ceux qui sont donnés comme exemples, dans trois je n'ai pu constater la présence du Bactériophage; s'il existait il était inactif vis-à-vis des huit bactéries test;

16 et 17, cochons vivant en Cochinchine dans une région où sévissait le barbone;

18 et 19, cochons vivant à Paris;

20 et 21, cochons vivant en France dans une ferme infectée de typhose aviaire (4 autres examens comparables),

22 et 23, lapins vivant en cage à l'Institut Pasteur (4 autres examens comparables);

24 et 25, chèvres vivant à Paris.

CONCLUSIONS

En somme, chez tous les animaux sains examinés, j'ai constaté la présence du Bactériophage doué de virulence vis-à-vis de l'une ou de l'autre des bactéries intestinales prises comme test

Ces examens montrent qu'en milieu épizootique le Bactériophage intestinal des animaux réfractaires est généralement doué de virulence pour la bactérie cause de l'épizootie, par contre le fait ne se produit jamais en dehors des foyers.

L'activité de l'ultramicrobe bactériophage vis-à-vis d'une bactérie donnée ne peut s'expliquer que par suite d'une culture aux dépens de cette bactérie Les recherches de la virulence de l'ultramicrobe chez les animaux séjournant en milieu épizootique ou en milieu indemne, vis-à-vis de la bactérie agent de l'épizootie considérée, sont entre autres preuves, concluantes à cet égard; les expériences *in vitro* sont d'accord avec les observations faites sur les animaux. Tous les faits concordent pour montrer que dans l'organisme l'ultramicrobe bactériophage cesse d'être actif vis-à-vis d'une bactérie peu de jours après la destruction de cette bactérie. Chez les ani-

maux, l'ingestion de bacilles typhiques, paratyphiques, et surtout dysentériques doit être extrêmement fréquente puisque chez ces animaux le Bactériophage intestinal est, à part de rares intermittences, doué de virulence pour l'une ou l'autre de ces bactéries.

De l'ensemble des résultats il semble se dégager qu'il se produit chez le Bactériophage des « covirulences » ou « virulences accessoires » s'étendant sur les bacilles appartenant au même groupe que le bacille envahisseur : par exemple le Bactériophage exaltant sa virulence pour le Bacille dysentérique de Shiga doit être à même d'attaquer, quoiqu'à un degré moindre, le Bacille de Flexner ou le Bacille de Hiss ou les deux à la fois. On s'expliquerait difficilement d'une autre manière que la virulence apparaisse simultanément pour plusieurs bacilles du même groupe. Ces covirulences s'étendent généralement sur des espèces bacillaires qui présentent entre elles le phénomène de coagglutination.

Chez l'Homme également, bien moins exposé à la contagion par suite de son mode de vie, l'activité de l'ultramicrobe bactériophage pour les bacilles typhique, paratyphiques et dysentériques est très fréquente. chaque fois qu'elle se produit, ce ne peut être que l'indication d'un début d'infection qui passe généralement inaperçu. le Bactériophage, par suite d'une adaptation rapide, détruit les germes envahisseurs avant toute multiplication (1)

L'ultramicrobe bactériophage est un hôte normal de l'intestin de tous les animaux : d'autre part nous avons vu qu'il jouit d'une très grande vitalité; grâce à son exiguité, il peut certainement filtrer à travers des terrains qui arrêtent les bactéries. Tout montre qu'il doit être extrêmement répandu dans le milieu extérieur : tout ce qui est susceptible d'être contaminé à un moment donné par des déjections d'un animal quelconque, doit le contenir : il doit exister partout ou il y a des êtres vivants : dans le sol, les cours d'eau et l'Océan (2).

(1) Il semble que, même chez les animaux réputés réfractaires, il se produise parfois un retard dans l'accoutumance du Bactériophage : on a signalé, par exemple, des cas de dysenterie à bacille de Shiga chez le Cheval, dans les pays tropicaux

(2) Dumas l'a isolé d'un échantillon de terre et dans l'eau de conduite de la ville de Paris.

La constatation de la présence du Bactériophage dans certaines eaux pourrait parfois offrir un certain intérêt, quant à l'origine de ces eaux.

CHAPITRE III

L'IMMUNISATION PAR LE BACTÉRIOPHAGE

ıunisatıon contre la typhose aviaıre. Immunisatıon contre le barbone. Immunısation contre la dysenterie. Conclusıon

.a seule preuve scientifiquement acceptable d'une théorie de l'Imnité ne peut être fournıe que par la reproduction de cette immuı chez l'animal naturellement sensible, et cela en plaçant expérintalement cet animal dans l'état auquel on attrıbue l'immunité.

Jne souche du Bactériophage active pour une bactérie donnée ıt s'isoler et se multiplier indéfiniment *in vıtro* aux dépens de te bactérie en conservant toute sa virulence, on peut en obtenir cultures en quantité aussi grande qu'on le désire.

Si la théorie de l'Immunité par le Bactériophage que nous avons luit-des recherches effectuées sur le malade est exacte, nous 'ons pouvoır reproduire à volonté chez le malade tous les phénones qui conduisent à la guérison pourvu qu'il n'existe pas, au ment de l'intervention, des lésions organiques ıncompatibles avec vie. Nous devons pouvoir également placer l'ındividu exposé à la ıtagion dans le même état réfractaire dont jouit l'individu qui a versé indemne toute la période épidémique

C'est à dessein que je me suis attaché jusqu'ici à étudier le rôle Bactériophage surtout dans les maladies animales, qui, seules, mettent la vérification expérimentale.

Les expériences d'immunisation au moyen des cultures du Bactéphage ont été effectuées de deux manières différentes :

en milieu épizootique sur la typhose avıaire, il s'agit donc d'une munisation vis-à-vis de la contamination naturelle,

en milieu non épizootique, avec épreuve expérimentale, dans le barbone. Ces dernières expériences m'ont permis de déterminer les conditions très particulières de l'immunisation par le Bactériophage.

IMMUNISATION CONTRE LA TYPHOSE AVIAIRE

Je ne reviendrai pas sur les expériences d'immunisation effectuées au laboratoire qui ont été exposées dans le chapitre traitant des phénomènes observés au cours des épizooties de typhose.

Les expériences d'immunisation en milieu épizootique présentent, dans le cas de la typhose aviaire, une difficulté spéciale, ou plutôt une complication. J'ai indiqué qu'à côté de la typhose type à *B. gallinarum*, il existait plusieurs espèces de paratyphoses, chacune causée par une espèce bactérienne spéciale. Je n'insisterai pas sur les différences que présentent ces espèces au point de vue des réactions biochimiques et agglutinatives qui les caractérisent, ces différences n'offrant au point de vue étudié ici aucun intérêt. En ce qui concerne l'action du Bactériophage sur chacune d'elles, une souche du Bactériophage douée d'une virulence extrême (++++) vis-à-vis de *B. gallinarum*, est douée de la même activité vis-à-vis de toutes les souches françaises ou américaines ainsi que vis-à-vis de *B. jeffersonii*, l'action est moins énergique pour *B. pullorum A* et encore moindre pour *B. pullorum B*, elle est nulle pour *B. pfaffi* et *B. rettegerei*. On a donc avec une telle souche du Bactériophage :

B. gallinarum ++++ ; *B. jeffersonii* ++++ ; *B. pullorum A* ++; *B. pullorum B* + ; *B. pfaffi o* ; *B rettegerei o*.

Inversement une souche du Bactériophage provenant de poules résistant à la paratyphose à *B. pfaffi* (foyer de TRAINEL, Aube), possède les virulences suivantes :

B. gallinarum o ; *B. jeffersonii o* ; *B. pullorum A o* ; *B pullorum B* + ; *B. pfaffi* ++++ ; *B. rettegerei o*.

Les expériences d'immunisation se compliquent donc singulièrement, d'autant plus qu'on observe l'existence de la typhose et de paratyphoses dans les mêmes foyers (ce qui se produit également pour la typhoïde humaine).

En pratique courante la solution serait aisée, il suffirait d'immu-

niser les volailles avec un mélange de cultures des diverses souches du Bactériophage actives contre les divers bacilles pathogènes, agents de la typhose et des paratyphoses ; pour des recherches préliminaires la chose n'était pas possible, la relation entre ces diverses maladies n'ayant pas encore été reconnue quand j'ai commencé ces recherches. Les divers bacilles, agents des paratyphoses avaient été étudiés aux États-Unis mais on n'avait pas déterminé leur présence simultanée dans les foyers de typhose et, en ce qui concerne *B. pfaffi* découvert par Pfaff dans une épizootie sévissant sur les canaris à Vienne, il n'avait jamais été incriminé comme susceptible de provoquer une maladie des gallinacés : je ne suis parvenu à dégager ces faits que peu à peu au cours des recherches.

Les cultures du Bactériophage employées dans les expériences d'immunisation ont été préparées de la manière suivante : une culture de *B. gallinarum* en bouillon Martin âgée de neuf à dix heures, c'est-à-dire très jeune mais présentant déjà un trouble accusé, est inoculée avec un Bactériophage, isolé des déjections d'une poule guérie, doué d'une haute virulence pour le bacille pathogène. Après douze heures environ, la lyse des bactéries complètement terminée et le bouillon de culture redevenu parfaitement limpide, la culture est filtrée sur bougie (1) puis répartie en ampoules qui sont scellées.

La dose employée pour l'immunisation a été dans tous les cas de 0,5 cm^3 par voie sous-cutanée. Le lieu de l'injection est indifférent car on n'observe jamais la moindre réaction locale ou générale.

Expérience I. — Expériences réalisées en 1919 et 1920 dans les environs d'Agen avec la collaboration de M. le médecin-vétérinaire Lambert.

Poulailler 1. — Début de l'épizootie en août 1919. Le 2 octobre, 110 poules sur 160 ont succombé. Les 40 survivantes, dont 5 déjà atteintes, sont inoculées avec la culture de Bactériophage. Les 5 poules malades guérissent, l'épizootie cesse brusquement et définitivement à partir du jour même de l'immunisation.

Poulailler 2. — Début de l'épizootie vers le 20 août. Le 6 octobre, 120 poules sur 200 ont succombé. Les 80 survivantes, dont 7

(1) Nous avons vu que quelle que soit la virulence du Bactériophage inoculé, on est toujours exposé à voir se produire une culture secondaire dans un certain nombre de tubes, la filtration est donc indispensable.

déjà malades, reçoivent l'injection de Bactériophage *anti-gallinarum*. Les 7 malades guérissent, l'épizootie cesse brusquement et définitivement.

Poulailler 3. — Début de l'épizootie le 10 octobre. Le 15 octobre, 21 poules ont succombé, les 130 survivantes, dont 8 déjà atteintes, sont inoculées. Les 8 malades guérissent, l'épizootie cesse définitivement à partir de ce jour.

Poulailler 4. — Début de l'épizootie vers le 15 novembre. Le 1er décembre, 26 poules sur 51 sont mortes; les 25 survivantes, parmi lesquelles 4 sont atteintes, sont inoculées. Une des malades succombe, les 3 autres guérissent. La mortalité cesse à partir du moment de l'inoculation.

Poulailler 5. — Début de l'épizootie vers le 25 novembre. Le 1er décembre 7 poules sur 60 ont succombé ; les 53 survivantes sont inoculées, dont 4 malades Les malades guérissent, aucun cas ne se produit à partir de ce moment.

Poulailler 6. — Début de l'épizootie le 16 décembre. Le 28 décembre 40 poules sur 142 ont succombé; les 102 survivantes, dont 3 sont atteintes, sont inoculées Les malades guérissent, l'épizootie cesse brusquement.

Poulailler 7. — Début de l'épizootie le 2 janvier. Le 14, 15 sur 50 ont succombé; les 35 survivantes sont inoculées. Aucun nouveau cas ne se produit à partir de ce moment.

Poulailler 8. — Début de l'épizootie vers le 15 janvier, mortalité journalière : 4 à 6 poules. Le 21 janvier les 121 survivantes sont inoculées, dont 5 malades. Les malades guérissent, l'épizootie cesse brusquement.

Poulailler 9. — Début de l'épizootie vers le 10 février. Le 20, 14 poules sur 84 ont succombé ; les 70 survivantes sont inoculées. L'épizootie cesse brusquement.

Poulailler 10. — Début de l'épizootie vers le 25 février. Le 1er mars 20 poules ont succombé ; les 120 survivantes dont 5 malades, sont inoculées. Les 5 malades guérissent, l'épizootie cesse brusquement.

Poulailler 11. — Début de l'épizootie le 4 février ; du 4 au 10, 10 poules succombent. Le 10 février les 48 survivantes sont inoculées à l'aileron avec 0,5 cm³ de culture du Bactériophage *anti-galli-*

narum, comme toutes les poules des dix expériences précédentes

L'épizootie continue son cours, 5 poules meurent du 10 au 17.

Le 17 février les 43 poules qui restent sont inoculées avec 0, 5 cm^3 d'un mélange de quatre souches du Bactériophage respectivement actives contre *B. gallinarum*, *B. pullorum*, A et B et *B. pfaffi*. L'épizootie cesse brusquement à partir du moment même de cette seconde vaccination.

Poulailler 12, voisin du précédent Les mêmes faits se reproduisent : une première inoculation, effectuée le 9 février sur 80 poules avec une culture de Bactériophage actif pour *B. gallinarum*, reste sans effet. L'épizootie cesse brusquement après une inoculation de Bactériophage actif pour les bacilles agents des paratyphoses, effectuée le 17 février

L'examen du sang d'une poule morte dans le poulailler n° 12 permit l'isolement d'un Bacille type *B. pfaffi* · il s'agissait donc pour les poulaillers 11 et 12 d'une épizootie de paratyphose.

Je ne reviendrai pas sur le cas de l'épizootie de paratyphose de Trainel, également à *B. pfaffi*, enrayée par l'inoculation de culture de Bactériophage anti-*pfaffi* ; dont j'ai parlé dans le chapitre relatif à la typhose.

Expérience II. — Réalisée à Poully en Auxois, avec la collaboration des médecins vétérinaires Voillot et Bouhier.

Poulailler 1. — Le 5 janvier, 20 poules sont prises au hasard dans un poulailler renfermant une centaine d'animaux où vient de se déclarer la typhose, ces 20 poules sont immunisées avec une culture du Bactériophage anti-*gallinarum*.

Le 7 février, les 20 poules immunisées sont toutes vivantes et en parfait état, l'épizootie a continué à sévir sur les poules non immunisées dont il ne reste plus qu'une vingtaine.

Poulailler 2. — Le 23 février les poules survivantes d'un poulailler renfermant alors 102 animaux sont immunisées. L'épizootie qui avait débuté une dizaine de jours auparavant, avec une mortalité journalière de 4 à 5 poules, cesse brusquement et définitivement à partir du moment même de l'immunisation. L'épizootie continuait par contre à sévir, avec [illegible] dans tous les poulaillers [illegible]

Expérience [illegible]

M. le médecin vétérinaire SORRIAU, dans un poulailler important où la typhose sévit à l'état enzootique depuis plusieurs mois avec une mortalité journalière de 2 à 3 animaux. Le 25 janvier les 225 survivantes sont immunisées. L'épizootie cesse brusquement et définitivement à partir du moment même de l'immunisation.

EXPÉRIENCE IV — Réalisée à Rouillac, Charente, avec la collaboration de M. le médecin vétérinaire CHOLLET. Le 15 décembre, 100 poules sont immunisées dans un poulailler où la typhose a fait son apparition une dizaine de jours auparavant, avec une mortalité journalière de 4 à 6 animaux. Arrêt brusque et définitif de l'épizootie à partir du moment de l'immunisation. La typhose continuait à sévir dans toutes les exploitations voisines Parmi les 100 poules inoculées, une douzaine étaient déjà atteintes, 2 seulement succombèrent 2 à 3 h. après l'injection.

EXPÉRIENCE V. — Réalisée à Carcassonne avec la collaboration de M. le Dr ORMIÈRES Début de l'épizootie dans le courant du mois d'août. Le 1er octobre, 80 poules ont succombé, les 120 survivantes sont immunisées. Arrêt brusque de l'épizootie à partir de ce jour même.

EXPÉRIENCE VI. — Réalisée avec la collaboration de M. le vétérinaire départemental MESNARD à Angoulême. Les poules ont été dans ces expériences immunisées par l'ingestion, sur du pain, de 1 cm³ environ de culture du Bactériophage anti-*gallinarum*.

1° Le 2 juillet les 50 poules survivantes d'un poulailler où sévit la typhose depuis 6 semaines, avec une mortalité journalière de 2 à 3 animaux, ingèrent chacune environ 1 cm³ de culture. Sept mois après, aucun nouveau cas ne s'était produit depuis le moment de l'ingestion.

2° Même expérience le 15 octobre sur une centaine de poules d'une exploitation voisine où la typhose sévissait depuis plusieurs mois. Arrêt brusque et définitif de l'épizootie

Dans les deux cas l'épizootie continua à sévir dans les poulaillers voisins gardés comme témoins.

Je crois inutile de multiplier les exemples : dans tous les cas le tableau a été le même, l'épizootie a cessé à partir du moment même où la culture du Bactériophage doué de virulence pour la bactérie pathogène, agent de l'épizootie, a été introduite dans l'organisme de

l'animal sensible, que ce fut par injection ou par ingestion. Nous verrons dans le chapitre suivant que ce dernier mode d'administration est moins recommandable

Par contre, comme nous l'avons vu, les injections de culture du Bactériophage actif pour *B. gallinarum*, agent de la typhose, n'ont en général aucune action quand l'épizootie est due à une paratyphose, particulièrement dans le cas de *B. pfaffi*. En pratique il suffirait d'injecter un mélange des diverses souches de Bactériophage actives vis-à-vis des bactéries pathogènes susceptibles de provoquer des épizooties chez les oiseaux de basse-cour, y compris une souche douée de virulence pour la bactérie du choléra des poules ; ce serait d'autant plus facile que la dose de 0,5 cm^3, que j'avais fixée arbitrairement, est certainement beaucoup trop considérable, comme nous allons le voir. Même en mélangeant cinq ou six souches différentes du Bactériophage, la quantité suffisante pour l'immunisation ne dépasserait pas une fraction de centimètre cube.

Au cours des expériences citées il n'a été fait aucune sélection, tous les animaux présents dans le poulailler, fussent-ils moribonds, ont reçu l'injection immunisante. Une centaine de poules malades ont ainsi été inoculées : la mortalité a été de 5 o/o, résultat appréciable puisque la mortalité chez les animaux atteints varie entre 100 o/o au début de l'épizootie, à 95 o/o quand, après quelques semaines, la maladie sévit à l'état sporadique.

Une culture de Bactériophage, comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, se compose d'ultramicrobes bactériophages en suspension dans un milieu où demeure la substance dissoute des corps des bactéries qui ont été détruites sous l'action de la lysine sécrétée par l'ultramicrobe. Quel est parmi ces divers principes celui qui joue un rôle actif dans la protection de l'animal sain ou déjà malade, dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire *en milieu contaminé?* Indubitablement ce sont les germes bactériophages eux-mêmes : la protection *immédiate* assurée par l'injection ou même l'ingestion de la culture du Bactériophage, suffit pour le démontrer ; une immunité organique demanderait nécessairement un certain temps pour se développer. Que d'autres phénomènes d'immunité, organiques cette fois, se produisent ensuite après un certain temps d'incubation, c'est ce que les expériences réalisées dans le barbone vont nous montrer.

Pour le moment constatons seulement que chez les animaux sensibles immunisés par une injection de culture du Bactériophage

actif vis-à-vis de la bactérie pathogène en cause, *en milieu contaminé*, c'est-à-dire dans un milieu où il se produit des réinfections fréquentes par suite de la dissémination de la bactérie pathogène dans le milieu extérieur, le rôle principal de protection est joué par le Bactériophage lui-même ; les autres phénomènes d'immunité qui peuvent se produire par la suite, sous l'influence des autres principes contenus dans la culture injectée, ne jouent dans de telles conditions qu'un rôle secondaire. Nous allons voir que cette proposition est renversée quand on opère en *milieu non contaminé*.

IMMUNISATION CONTRE LE BARBONE (1)

Grâce à la libéralité du Gouvernement de la Cochinchine qui a mis à notre disposition tous les animaux, taurillons et buffles, dont nous avions besoin, nous avons pu étudier en détail les conditions particulières de l'immunisation par les cultures du Bactériophage. Le barbone est d'ailleurs la maladie idéale pour une étude de ce genre. Le sang prélevé sur un animal qui vient de succomber se conserve en ampoules scellées pendant au moins six mois, sans que les bactéries qu'il renferme perdent quoi que ce soit de leur virulence : du bouillon ensemencé avec une goutte de ce sang fournit une culture qui tue régulièrement le taurillon ou le buffle à la dose de un cinq millième de centimètre cube ; un dix millième tue en moyenne un animal sur deux La maladie expérimentale reproduit la maladie naturelle jusque dans ses moindres détails : même courbe de température, mêmes symptômes, y compris l'œdème caractéristique au point d'entrée du virus dans l'organisme ; comme dans la maladie naturelle la mort est fatale, tout animal malade succombe et la mort survient dans le même temps dans les deux cas, soit de 12 à 18 h après l'apparition des premiers symptômes ; les lésions décelables à l'autopsie sont identiques. Les expériences d'immunisation effectuées sur une telle maladie fournissent donc des résultats absolus.

Je dirai une fois pour toutes que chaque fois que l'immunité d'un animal a été vérifiée par l'inoculation de culture de la bactérie du

(1) Expériences réalisées à Saïgon avec la collaboration de G. Le Louet, chef du Service vétérinaire de la Cochinchine.

barbone, l'épreuve a été contrôlée par l'inoculation d'une dose égale à un animal neuf témoin de même poids et que jamais un témoin n'a résisté. De plus, quoiqu'aucun doute ne fut possible touchant la cause de la mort, la vérification en a été pourtant faite par l'examen microscopique, l'ensemencement du sang et la constatation des lésions à la nécropsie. La température des animaux d'expérience étant régulièrement prise matin et soir, la plus légère réaction chez les animaux immunisés ne pouvait passer inaperçue.

La souche de Bactériophage employée pour la préparation des cultures destinées aux expériences d'immunisation, avait été isolée des déjections d'un buffle ayant traversé indemne l'épizootie dont il a été parlé dans le chapitre précédent. Ce Bactériophage possédait au sortir de l'organisme une virulence forte (+++) pour la bactérie du barbone ; après une dizaine de passages *in vitro* la virulence devint extrême (++++), c'est à partir de ce moment qu'il a été employé.

Une culture de la bactérie du barbone en bouillon, âgée d'une douzaine d'heures, déjà bien louche, est additionnée d'une goutte d'une culture antérieure du Bactériophage anti-barbone d'activité (++++) ; après une douzaine d'heures, le milieu étant redevenu parfaitement limpide, la culture est filtrée sur bougie Chamberland L3, puis répartie en ampoules qui sont scellées. J'appelle l'attention sur la nécessité de n'employer que des cultures du Bactériophage dans lesquelles la lyse de la bactérie a été complète, c'est-à-dire d'une limpidité parfaite ; ces cultures doivent de plus être filtrées vu le fait d'une culture secondaire possible dans un certain nombre d'ampoules.

Les cultures du Bactériophage anti-barbone ont été utilisées après des temps variables, de vingt jours à cinq mois après leur préparation ; nous n'avons observé aucune différence dans le mode d'action, quel que fut le temps écoulé entre le moment de la préparation et celui de l'utilisation.

Toutes les expériences, sauf celles qui ont trait à l'influence de l'âge des animaux sur l'obtention de l'immunité, ont été effectuées sur des taurillons de race indigène, en parfait état de santé, âgés de douze à dix-huit mois, d'un poids moyen de 100 kgr. (1) et sur des buffles ayant de un à douze ans. Les races bovine et buffaline sont également sensibles au barbone ; PIOT a vu en Egypte les troupeaux

(1) La race indochinoise est de petite taille.

de bœufs décimés par le barbone dans la même proportion que les troupeaux de buffles, d'après nos constatations le Buffle serait plus facilement immunisable que le Bœuf.

Je passerai d'abord en revue les expériences réalisées dans le but de déterminer dans quelles conditions interviennent, dans l'établissement de l'immunité acquise à la suite de l'injection de culture du Bactériophage, la dose injectée et l'âge des animaux, qui constituent les deux facteurs principaux dont la variation influe le plus sur le résultat. Pour la facilité de l'exposition j'indiquerai successivement l'effet de doses de moins en moins élevées; en réalité l'ordre chronologique des expériences a été un peu différent : nous avions commencé les essais par l'injection d'une dose arbitrairement fixée à 5 cm³, les animaux en expérience étant morts lors de l'épreuve effectuée vingt jours plus tard, nous avions pensé la dose insuffisante; nous avions alors essayé 20 cm³, sans plus de résultat, ce n'est qu'ensuite que nous en sommes arrivés à l'emploi de doses faibles qui se sont montrées efficaces Nous voyons déjà que l'immunisation au moyen de culture du Bactériophage présente des particularités spéciales.

I RECHERCHE DE LA DOSE IMMUNISANTE. — 1° Huit taurillons reçoivent 20 cm³ de culture du Bactériophage par voie sous-cutanée. Six sont éprouvés, après un laps de temps variant de 15 à 40 jours, par l'inoculation d'une quantité de culture de la bactérie du barbone représentant 50 doses sûrement mortelles : tous succombent en même temps que les témoins.

Les deux derniers sont éprouvés, également avec 50 doses mortelles, 60 jours après l'injection immunisante : ils résistent sans présenter aucun trouble apparent Deux témoins meurent 19 et 22 h. après l'inoculation virulente.

2° Quatre taurillons reçoivent, toujours par injection sous-cutanée, 5 cm³ de culture du Bactériophage; trois sont éprouvés après 13, 15 et 28 jours par l'inoculation de 50 doses mortelles de bactéries virulentes : tous succombent en même temps que les témoins. Le quatrième est éprouvé le quarantième jour, il résiste sans présenter aucune réaction. Le témoin meurt en 22 h.

3° quarante animaux : 24 taurillons, 4 bufflons âgés de un à deux ans, 12 buffles adultes, reçoivent une injection de 1/4 de cm³ de culture du Bactériophage.

A. Huit taurillons sont éprouvés entre le troisième et le douzième

jour suivant l'injection, par l'inoculation de culture virulente représentant suivant les animaux, de 5 à 1.000 doses sûrement mortelles : tous succombent.

B. Douze taurillons et un bufflon sont éprouvés entre le treizième et le vingtième jour, tous par l'inoculation de 1.000 doses sûrement mortelles de cultures de la bactérie du barbone : cinq résistent, les autres succombent. Voici le détail de cette expérience.

		Epreuve (1.000 doses mort.) après :	Résultat
		—	—
Bufflon		13 jours	résiste sans présenter aucune réaction.
Taurillon	50	15 —	meurt 26 h. après inoculation
—	52	15 —	— 20 — —
—	53	15 —	— 23 — —
—	55	15 —	— 26 — —
—	56	15 —	— 25 — —
—	38	15 —	résiste sans présenter de réactions
—	27	16 —	meurt 68 h. après inoculation.
—	20	16 —	résiste sans présenter de réactions
—	28	17 —	— —
—	30	17 —	— —
—	89	17 —	meurt 34 h. après inoculation
—	90	17 —	— 32 — —

Deux taurillons témoins succombent 22 et 26 h. après l'inoculation virulente, un bufflon témoin en 19 h.

C. Vingt animaux : 5 taurillons, 3 bufflons et 12 buffles adultes sont éprouvés de 21 à 60 jours après l'injection immunisante, tous par l'inoculation de 1.000 doses sûrement mortelles de culture de la bactérie du barbone : *tous* résistent sans présenter aucune réaction. Cinq témoins succombent, tous entre 16 et 23 h. après l'inoculation virulente.

4° Huit taurillons reçoivent 1/25 de cm³ de culture du Bactériophage. Ils sont éprouvés après un nombre de jours variable, par l'inoculation de 5 doses sûrement mortelles de culture virulente ; voici les résultats :

taurillon 107, éprouvé après 1 jour, résiste sans réactions ;
— 103, — 1 — — —
— 106, — 2 — meurt 36 h. après inoculation ;
— 101, — 3 — — 28 h. —
— 83, — 4 — résiste sans réaction ;
— 84, — 4 — [illegible]
— 104, — 5 — [illegible]

Le dernier taurillon, 102, est éprouvé 60 jours après l'injection immunisante par l'inoculation de 50 doses sûrement mortelles de culture de la bactérie du barbone : il résiste sans présenter aucun trouble

Enfin une dernière expérience de contrôle, réalisée en vue de l'application pratique de l'immunisation des buffles contre le barbone, a été effectuée par M. le LOUET après mon départ de Saigon : douze taurillons ont reçu par injection sous-cutanée 1/4 de cm³ de culture du Bactériophage ; éprouvés vingt-cinq jours plus tard par l'inoculation de deux mille doses sûrement mortelles de culture de la bactérie du barbone, ils ont tous résisté sans présenter la plus légère réaction Les témoins sont morts de 18 à 22 h après l'inoculation.

L'injection de culture du Bactériophage n'a déterminé chez aucun des animaux immunisés, même à la dose de 20 cm³, la plus minime réaction, soit locale soit thermique. La courbe de température des animaux immunisés reste continuellement surperposable à celle des animaux témoins neufs : on voit donc que, contrairement à l'opinion actuelle, une immunité confinant à l'état réfractaire peut s'acquérir sans que l'animal manifeste la plus légère réaction

Au cours des expériences la fièvre aphteuse a fait son apparition à Saigon, les animaux à ce moment en cours d'immunisation l'ont contractée, cette complication n'a dans aucun cas exercé une influence sur l'obtention de l'immunité.

On peut déduire de ces diverses expériences qu'avec de fortes doses de culture du Bactériophage l'immunité est très lente à s'établir, soit de quarante à soixante jours avec une dose de 20 cm³, plus de vingt-huit jours avec 5 cm³. Avec 1/4 de cm³ elle n'est effective, pour tous les animaux, que vers le vingtième jour : elle leur permet alors de résister sans trouble apparent à une épreuve expérimentale effectuée avec deux mille doses sûrement mortelles de culture de la bactérie du barbone, c'est-à-dire que l'immunité conférée confine à l'état réfractaire. Avec la dose minime de 1/25 de cm³, soit moins d'une goutte normale, une immunité solide est acquise dès le quatrième jour ; ne nous occupons pas pour l'instant des taurillons qui ont résisté après 24 h., l'immunité dont ils jouissaient était d'un ordre différent, comme nous le verrons plus loin.

Nous avons vu dans la première partie de cet ouvrage que le sérum de lapins qui ont reçu quatre injections de culture du Bactériophage jouit de la propriété de sensibiliser les animaux vis-à-vis de la bactérie pour laquelle le Bactériophage injecté était actif : le

retard dans l'établissement de l'immunité à la suite de l'injection de fortes doses de culture du Bactériophage anti-barbone doit certainement être lié au même phénomène. L'injection produit chez l'animal deux phénomènes d'ordre différent : l'immunité et la sensibilisation qui varient respectivement d'intensité suivant la dose inoculée ; avec une faible dose la première l'emporte sur la seconde qui disparaît rapidement, avec une forte dose au contraire l'action inhibitive persiste pendant un temps fort long, environ soixante jours pour une injection de 20 cm^3. Comme nous l'avons vu pour le lapin la sensibilisation domine et persiste si l'on répète les injections de culture du Bactériophage (1).

L'expérience montre de plus que l'immunité conférée par l'injection de culture du Bactériophage est absolue une fois établie et nulle pendant la période d'incubation, sans état intermédiaire. Les animaux jeunes ou adultes qui reçoivent l'inoculation d'épreuve pendant la période d'incubation succombent, à très peu d'exceptions près, dans le même temps que les témoins, même si cette inoculation a lieu à un moment très rapproché de celui où tous les animaux immunisés résistent ; d'un autre côté tous ceux qui sont éprouvés après la période d'incubation résistent sans présenter aucun malaise apparent, quelle que soit la dose d'épreuve. Il semble bien résulter de ces constatations qu'après un temps d'incubation, plus ou moins prolongé suivant la dose de culture du Bactériophage injectée, temps pendant lequel l'animal reste aussi sensible qu'un animal neuf, l'immunité croisse très rapidement à partir du moment où elle commence à se manifester. En un mot, le déclanchement de l'immunité se fait brusquement.

INFLUENCE DE L'AGE DES ANIMAUX SUR L'OBTENTION DE L'IMMUNITÉ. — Nous venons de voir que trente-deux animaux, taurillons ou buffles jeunes ou adultes de moins de douze ans, ont tous acquis une immunité voisine de l'état réfractaire vingt jours après l'injection de 1/4 de cm^3 de culture du Bactériophage. Nous avons voulu voir comment se comportaient les vieux animaux.

Trois buffles entre quatorze et seize ans et 5 très âgés, ne travail-

(1) L'anaphylaxie nous offre un exemple d'un phénomène de même ordre : plus la dose sensibilisante est faible, plus rapproché est le moment où l'animal est sensibilisé. Par exemple, avec une dose de un millième de cm^3 de sérum, le cobaye est sensibilisé après quatorze jours environ ; avec 5 cm^3 la sensibilisation ne se produit qu'après plusieurs mois.

lant plus et ayant certainement plus de vingt ans (1) reçurent 1/4 de cm³ de culture du Bactériophage. Tous les huit sont éprouvés quarante-trois jours plus tard par l'inoculation de 1.000 doses sûrement mortelles de culture de la bactérie du barbone, en même temps qu'un témoin adulte neuf qui meurt en 17 h.

Parmi les trois buffles les moins âgés, un résiste sans présenter d'autre réaction qu'un léger œdème passager au point d'inoculation ; les deux autres présentent un œdème volumineux et sont manifestement malades, ils résistent pourtant et peuvent être considérés comme normaux six jours après l'inoculation d'épreuve. Les 5 buffles très âgés succombent après 48, 53, 54, 60 et 142 h., c'est-à-dire avec un retard considérable sur le témoin. Quinze buffles jeunes immunisés et éprouvés en même temps résistent tous sans présenter aucune réaction.

Il est évident que la dose d'épreuve était énorme, cela n'enlève rien au fait et l'on peut conclure que chez les vieux animaux l'immunité est acquise d'autant plus difficilement qu'ils sont plus âgés. L'immunité relative vis-à-vis d'une épreuve expérimentale extrêmement sévère ne s'observe que chez ces vieux animaux, chez les animaux jeunes ou adultes dans la force de l'âge, l'immunité, comme nous venons de le voir, est nulle pendant la période d'incubation et entière aussitôt qu'elle se manifeste.

Principe immunisant — Dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire *en milieu non contaminé* quel est, dans une culture du Bactériophage, le principe qui intervient dans l'immunisation ?

Une culture du Bactériophage renferme, comme nous le savons :

1° des ultramicrobes bactériophages,

2° des substances solubles contenues dans le milieu de culture, substances solubles provenant des corps des bactéries aux dépens desquelles se sont développés les ultramicrobes, puis les lysines sécrétées par ces ultramicrobes et qui restent dans le milieu une

(1) Le buffle vit en général de vingt-cinq à trente ans L'Annamite ne tue jamais un buffle . vieux et ne pouvant plus travailler, il le nourrit et le soigne aussi bien que les animaux jeunes L'attachement de l'indigène pour ses buffles est tel qu'il est très difficile d'obtenir qu'il vende un de ses animaux ; ceux qui ont servi aux expériences nous ont été procurés, les uns par l'intermédiaire de M le Gallen, gouverneur de la Cochinchine, les autres par M. Privé, directeur des plantations d'An Loc et Suzannah. sans tenir compte des pertes possibles. Je tiens à les remercier bien sincèrement.

fois la lyse terminée ; enfin, éventuellement, des anti-lysines de défense sécrétées par les bactéries

L'allure seule du phénomène nous montre déjà que le principe immunisant doit être différent suivant que l'immunisation se produit *en milieu contaminé*, comme c'était le cas pour les expériences concernant la typhose, ou *en milieu non contaminé*, pour celles touchant le barbone : dans les premières l'immunité a été immédiatement acquise, dans les secondes elle n'est devenue effective qu'après un temps d'incubation. L'expérience directe permet d'ailleurs de trancher la question.

1° Si l'on injecte à des taurillons, par voie sous-cutanée, de 5 à 20 cm³ de culture du Bactériophage anti-barbone on peut isoler des ultramicrobes actifs du sang pendant les premières 24 h. qui suivent l'injection, passé ce temps ils ont disparu L'expérience montre de plus que les ultramicrobes passent rapidement dans l'intestin : on peut les isoler des déjections à partir d'une douzaine d'heures après l'injection, ils y persistent un peu plus longtemps que dans la circulation, deux ou trois jours, jusqu'à six jours dans un seul cas ; en tous cas ils ont disparu de l'organisme bien avant que l'immunité soit établie. Répétons que cette constatation ne s'applique que dans le cas considéré de l'introduction du Bactériophage dans l'organisme effectuée en milieu non contaminé, nous avons vu, par exemple, que cinq mois après la cessation d'une épizootie de barbone on peut encore isoler un Bactériophage actif contre la bactérie pathogène des déjections des buffles qui ont résisté ; d'autre part l'expérimentation sur la Poule nous a montré qu'on pouvait maintenir l'activité du Bactériophage vis-à-vis de la bactérie pathogène aussi longtemps qu'on continuait à faire ingérer ces bactéries par l'animal en expérience.

2° Bablet a montré que les germes bactériophages sont détruits par un séjour d'une semaine dans la glycérine D'autre part ce liquide n'exerce aucune influence destructive ni sur les diastases ni sur les toxines : on peut donc présumer que dans un mélange de culture du Bactériophage et de glycérine, les ultramicrobes seuls seront détruits et que les substances immunisantes éventuellement contenues dans le milieu resteront intactes.

Partant de cette hypothèse nous avons mélangé 0,5 cm³ de culture du Bactériophage anti-barbone avec 9,5 cm³ de glycérine. Après un séjour du mélange à l'étuve à 37° prolongé pendant dix jours et après nous être assuré que les ultramicrobes bactériopha-

ges étaient effectivement détruits, nous avons inoculé deux taurillons avec ce liquide dilué dans 500 cm^3 d'eau salée : chaque taurillon reçut donc 1/4 de cm^3 de la culture primitive. Éprouvés après 45 jours, respectivement avec 5 et 50 doses mortelles de culture de la bactérie du barbone, ces deux animaux résistèrent, ils avaient donc acquis l'immunité malgré la destruction des ultramicrobes bactériophages.

Dans le cas du barbone expérimental, les expériences étant réalisées en milieu indemne, le principe qui intervient dans l'établissement de l'immunité est vraisemblablement constitué par la substance des corps bactériens. Le rôle du Bactériophage se borne ici à dissoudre les bactéries dont la substance se trouve alors dans un état particulièrement propre à impressionner les cellules de l'organisme qui jouent un rôle dans la production de l'immunité organique. La substance des corps bactériens dissoute dans le milieu sous l'action des lysines sécrétées par les ultramicrobes bactériophages, ne se trouve d'ailleurs certainement pas dans le même état sous lequel elle existait dans le corps de la bactérie vivante, car le Bactériophage n'agit pas simplement en produisant une désagrégation, et ce qui le montre, c'est que le milieu de culture devient parfaitement limpide ; il resterait nécessairement louche dans le cas d'une simple désagrégation Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, la dissolution des bactéries se produit sous l'influence de lysines, de diastases, qui opèrent une solubilisation de la, ou plutôt des substances composant le corps bactérien, solubilisation qui s'accompagne nécessairement d'un changement d'état. Ce n'est donc pas à proprement parler la substance même des bactéries qui constituerait le principe provoquant la formation de l'immunité, mais en réalité des corps nouveaux résultant de la dégradation des substances composant le corps de la bactérie, sous l'influence des lysines sécrétées par l'ultramicrobe bactériophage.

Il est évident qu'il ne s'agit là que d'une hypothèse ; l'expérience montre seulement que le principe qui provoque l'apparition de l'immunité n'est pas, dans les conditions de l'expérience, le Bactériophage en tant qu'être vivant. Les divers principes existant dans la culture, autres que les substances dissoutes des corps bactériens, à savoir : les corps des ultramicrobes morts, les lysines et éventuellement les anti-lysines, jouent-ils un rôle dans le phénomène de l'acquisition de l'immunité ? Il est encore impossible de l'affirmer ou de le nier en l'état actuel des recherches.

Nous avons vérifié l'action de la température sur l'élément immunisant contenu dans le bactériolysat. A cet effet nous avons repris l'expérience de la culture du Bactériophage traitée par la glycérine avec cette différence que cette culture a été soumise préalablement à une température de 56° maintenue pendant une demi-heure. Deux taurillons ont reçu chacun une dose de cette culture chauffée et glycérinée correspondant à 1/4 de cm^3 de la culture primitive. Après quarante-cinq jours ils ont été éprouvés respectivement avec 5 et 50 doses mortelles de culture de la bactérie du barbone . le premier a résisté, le second est mort. Le principe immunisant contenu dans la culture du Bactériophage n'est pas détruit mais sensiblement affaibli par un chauffage d'une demi-heure à 56°.

S'il ne nous est pas encore possible de savoir quel est le processus qui régit l'établissement de l'immunité, nous pouvons tout au moins en connaître le résultat et voir quelle est la propriété qui distingue un animal immunisé par l'injection d'une culture du Bactériophage, d'un animal neuf.

Dans le cas de l'immunité acquise à la suite d'une atteinte d'une maladie contagieuse le sang jouit de propriétés préventives ; le sang des animaux immunisés jouit de la même propriété comme le montrent les expériences suivantes :

1° Le taurillon 54 reçoit le 5 novembre, 1/4 de cm^3 de culture du Bactériophage anti-barbone. Quatorze jours plus tard on prélève 500 cm^3 de sang qui sont recueillis dans un flacon contenant 25 cm^3 d'une solution de citrate de soude à 10 0/0 ; ce sang est immédiatement injecté dans la jugulaire du taurillon 43. Ce dernier est éprouvé 23 h. plus tard avec 1.000 doses mortelles de culture de la bactérie du barbone : il résiste sans présenter la plus légère réaction. Un témoin meurt en 23 h.

Le taurillon 54 résiste également à l'inoculation de 1.000 doses mortelles le 13 décembre

2° Même expérience que ci-dessus : le taurillon 112 reçoit dans la jugulaire 500 cm^3 de sang du taurillon 95, ils résistent tous deux à l'épreuve.

3° Le taurillon 104 reçoit le 29 décembre une injection sous-cutanée de 1/25 de cm^3 de culture du Bactériophage ; quatre jours plus tard on prélève comme précédemment 500 cm^3 de sang qui sont transfusés au taurillon 108 Le lendemain les deux taurillons résistent à l'inoculation de 5 doses mortelles qui tuent un témoin en 32 h.

4° Même expérience que la précédente : le taurillon ayant reçu le sang de l'animal immunisé n'a été éprouvé par l'inoculation de 50 doses mortelles que 45 jours après la transfusion ; il a résisté sans présenter aucun trouble apparent, de même d'ailleurs que le taurillon directement immunisé lui-même.

Cette dernière expérience ne prouve d'ailleurs rien quant à la durée de l'immunité passive conférée par le sang d'un animal immunisé, car il s'agit d'un sang homologue, et nous savons que l'immunité est alors de beaucoup plus longue durée que s'il s'agissait d'un sang hétérologue. En tous cas l'immunité passive ainsi conférée est extrêmement puissante et ces expériences ouvrent la voie à des recherches tendant à l'obtention de sérums thérapeutiques provenant d'animaux immunisés par une *seule* injection d'une culture d'un Bactériophage actif et cela, non pas seulement pour le barbone, mais d'une manière générale.

On pourrait penser que le « principe » contenu dans le sang de l'animal immunisé et qui confère l'immunité passive n'est autre que la culture du Bactériophage qui persisterait pendant un certain temps dans la circulation ; il n'en est rien, car si le sang est prélevé à un moment assez rapproché de celui de l'injection immunisante pour que l'immunité ne soit pas encore effective, c'est-à-dire pendant la période d'incubation, l'animal auquel ce sang est transfusé ne jouit d'aucune immunité.

Les taurillons 89 et 90 reçoivent le 19 décembre, 1/4 de cm^3 de culture du Bactériophage par voie sous-cutanée ; seize jours plus tard on prélève à chacun d'eux 500 cm^3 de sang qui sont transfusés respectivement aux taurillons 92 et 93. Les quatre animaux éprouvés le lendemain succombent sans aucun retard sur les témoins

Le taurillon 46 reçoit le 5 novembre, 20 cm^3 de culture du Bactétiophage, le 19 novembre on prélève 500 cm^3 de son sang qui sont transfusés au taurillon 42 ; les deux taurillons succombent à l'épreuve en même temps qu'un témoin.

Comme on le voit l'incubation de l'immunité chez les animaux qui reçoivent l'injection immunisante de culture du Bactériophage, marche de pair avec l'apparition du pouvoir protecteur dans leur sang. L'immunité se déclanche brusquement, de même le pouvoir protecteur apparaît brusquement au même moment.

Quel est donc le principe immunisant qui fait brusquement son apparition dans le sang au moment où s'établit l'immunité, même chez des animaux qui n'ont reçu que la minime dose d'une seule goutte de culture du Bactériophage ?

Serait-ce une sensibilisatrice ? Nullement, car la réaction de fixation du complément montre que le sérum des animaux immunisés avec des cultures du Bactériophage ne contient pas de sensibilisatrice spécifique en quantité décelable. En opérant la réaction de Bordet avec 1/2 cm³ de sérum, on obtient une hémolyse identiquement semblable, comme intensité et comme temps, à celle qui se produit dans un tube témoin contenant la même quantité de sérum normal.

J'ai alors recherché le pouvoir opsonique de ces sérums : deux échantillons m'ont fourni des indices de 0,3 et 0,4, c'est-à-dire que l'indice est négatif (1).

Le sérum contenant le principe protecteur ne renferme pas de substances empêchant ou même gênant la culture de la bactérie du barbone. Du bouillon, mélangé avec un tel sérum, en n'importe quelle proportion (de 1/20 à 3 cm³ pour 10 cm³ de bouillon), avec ou sans addition de sérum frais de cobaye, fournit un milieu qui, ensemencé, donne des cultures luxuriantes de la bactérie du barbone

Le sérum, enfin, ne contient pas trace d'agglutinine.

L'immunité organique n'est donc due ni à la présence d'une sensibilisatrice, ni à la présence d'une opsonine dans le sang des sujets vaccinés Le sang ne contient de plus, ni agglutinine, ni substances empêchantes. Il s'agit vraisemblablement d'une antitoxine.

Nous avons vu dans les expériences réalisées dans la typhose aviaire, que, *en milieu contaminé*, la protection de l'animal était immédiate et que cette protection était assurée uniquement par la présence des ultramicrobes bactériophages virulents pour la bactérie pathogène. Nous avons retrouvé cette immunité immédiate dans le cas du barbone : c'est elle qui a assuré la protection des taurillons 103 et 107 contre l'inoculation de cinq doses mortelles de culture de la bactérie du barbone, 24 h. seulement après l'injection de la culture du Bactériophage

Dans la typhose cette immunité hétérologue a été permanente, car les réinfections journalières qui se produisent en milieu contaminé permettent au Bactériophage de se cultiver aux dépens des

(1) Nous avons vu dans la première partie que la lysine sécrétée par l'ultramicrobe Bactériophage possédait un pouvoir opsonique très élevé, l'organisme a dû répondre à une injection de lysine (certainement contenue dans la culture du Bactériophage) par la production d'un anti-corps antiopsonique.

bactéries pathogènes ingérées et de garder ainsi sa virulence vis-à-vis de cette bactérie. Dans le barbone le même fait se produit en milieu contaminé puisque nous avons vu le Bactériophage virulent pour la bactérie du barbone être présent dans l'intestin des buffles cinq mois après la cessation complète de l'épizootie.

En milieu indemne, ce qui était le cas pour les expériences effectuées sur le barbone, il n'en est pas de même : en l'absence de réinfection le Bactériophage actif pour la bactérie en cause s'élimine très rapidement de l'organisme, puisqu'il ne peut se cultiver aux dépens de cette bactérie, l'immunité hétérologue disparaît avec lui, c'est-à-dire après un ou deux jours, l'animal redevient alors sensible Il se maintient tel pendant toute la durée de l'incubation de l'immunité organique, qui se développe sous l'influence des produits solubles contenus dans la culture du Bactériophage ; dès que cette immunité organique s'est établie, l'animal devient réfractaire.

Nous allons voir, à propos de la dysenterie, qu'à une injection de culture du Bactériophage l'organisme répond par la production d'une anti-toxine . il semble probable qu'il en est de même dans le barbone et que le principe protecteur existant dans le sang, qui n'est ni une sensibilisatrice ni une opsonine, soit également une antitoxine, réponse de l'organisme à l'injection de la substance lysée et modifiée des corps bactériens contenus dans la culture du Bactériophage.

En résumé l'injection au Buffle ou au Bœuf d'une culture du Bactériophage actif pour la bactérie du barbone confère une immunité voisine de l'état réfractaire, mais qui n'est acquise qu'après un temps variable d'incubation suivant la dose injectée, et d'autant plus long que cette dose a été plus élevée.

Une injection unique de 1/25 de cm³, soit moins d'une goutte normale pour un taurillon de cent kilogrammes, met déjà l'animal en état de résister à une inoculation d'épreuve effectuée quatre jours plus tard, représentant cinq doses mortelles. Soixante jours plus tard l'animal résiste à une inoculation d'épreuve représentant cinquante doses sûrement mortelles.

En ce qui concerne les très vieux animaux, l'immunité étant vérifiée par une épreuve expérimentale extrêmement sévère, plus l'animal est âgé, moins l'immunité conférée est forte.

L'injection de culture du Bactériophage confère à l'animal :

1° Une immunité hétérologue uniquement due à la présence dans 'organisme des ultramicrobes bactériophages virulents vis-à-vis de a bactérie du barbone, qui assurent la destruction des bactéries dès eur introduction dans l'organisme. Cette immunité cesse aussitôt que ces ultramicrobes ont été éliminés de l'organisme. En l'absence le réinfections fréquentes qui leur permettent de continuer à se ultiver dans l'organisme en gardant leur virulence pour la bactérie n cause, ce qui est le cas pour les expériences réalisées en milieu ndemne, cette élimination est très rapide.

2° Une immunité homologue ou organique, provoquée par une éaction de l'organisme de l'animal sous l'influence des principes olubles contenus dans la culture du Bactériophage injectée ; cette mmunité organique se caractérise principalement par l'apparition lans le sang d'un principe immunisant extrêmement puissant qui est raisemblablement une anti-toxine L'immunité organique s'établit brusquement après un temps d'incubation variable suivant la dose le culture du Bactériophage injectée et d'autant plus longue que ette dose a été plus élevée.

L'injection de sang provenant d'un animal immunisé à un animal neuf confère à ce dernier une immunité passive aussi solide que celle dont jouit l'animal activement immunisé lui-même, même si ce lernier n'a reçu qu'une unique injection de 1/25 de cm³ de culture lu Bactériophage, et cette immunité passive est encore entière quarante-cinq jours après l'injection de sang, tout au moins dans es conditions de l'expérience.

IMMUNISATION CONTRE LA DYSENTERIE

« Les cultures lysées de Shiga sous l'action du microbe invisible, « qui sont en réalité des cultures du microbe anti, jouissent de la « propriété d'immuniser le lapin contre une dose de bacilles de « Shiga tuant les témoins en cinq jours ». C'est ce que j'indiquais lans la première communication concernant le Bactériophage. Voici l'exposé des expériences sur lesquelles était basée cette affirmation.

Le lapin, naturellement réfractaire à la dysenterie bacillaire, est par contre sensible à l'inoculation de la toxine dysentérique : il peut

être utilisé pour des expériences *préliminaires* d'immunisation antitoxique

Les expériences suivantes montrent d'abord que la culture du Bactériophage anti-SHIGA, peu de temps après la lyse, est toxique, quoiqu'à un degré moindre qu'une culture normale de Bacilles de SHIGA.

Lapin 1, 10 août : 1 cm^3 culture normale de SHIGA en injection intra-veineuse, mort le 16 août,

Lapin 2, 10 août 2 cm^3 culture normale de SHIGA en injection sous-cutanée mort le 16 août

Lapin 3, 10 août 1 cm^3 culture de SHIGA lysée depuis 6 heures (même concentration bacillaire que les précédentes) en injection intra-veineuse : résiste.

Lapin 4, 10 août 2 cm^3 culture de SHIGA lysée depuis 6 heures en injection sous-cutanée mort le 16 août

Six jours après la lyse, la toxicité est déjà fort atténuée.

Lapin 5, 10 août 2 cm^3 culture de SHIGA lysée depuis 6 jours, en injection intra-veineuse résiste

Lapin 6, 10 août 3 cm^3 culture de SHIGA lysée depuis 6 jours, en injection sous-cutanée résiste

Lapin 7, 10 août . 5 cm^3 culture de SHIGA lysée depuis 6 jours en injection intra-veineuse mort le 21 août

Après un mois, la toxicité a disparu.

Lapin 8, 10 août 15 cm^3 cultures de SHIGA lysée depuis 1 mois en injection sous-cutanée résiste

Lapin 9, 10 août . 10 cm^3 de la même culture en injection intra-veineuse : résiste

Expériences d'immunisation.

Le 23 août . huit lapins reçoivent une injection sous-cutanée de 1/4 de cm^3 de culture du Bactériophage anti-SHIGA, deux mois après la lyse. Ils sont éprouvés avec 3 cm^3 d'une culture de bacilles de SHIGA en bouillon de 24 heures, ce qui, avec la souche employée, représentait deux doses sûrement mortelles. La souche de bacille dysentérique de SHIGA employée pour l'épreuve était différente de celle qui avait servi à préparer l'émulsion lysée par le Bactériophage.

Lapin 10, éprouvé après 48 heures, succombe 6 jours plus tard.
Lapin 11, éprouvé après 4 jours, succombe 5 jours plus tard.
Lapin 12, éprouvé après 6 jours, résiste
Lapin 13, éprouvé après 8 jours, résiste.
Lapin 14, éprouvé après 10 jours, résiste.

Lapin 15, éprouvé après 1 mois, résiste
Lapin 16, éprouvé après 2 mois, résiste
Lapin 17, éprouvé après 3 mois, résiste

Tous les lapins témoins inoculés avec la moitié de la dose, soit 1,5 cm³ de ulture du bacille de SHIGA, succombèrent entre quatre et sept jours.

Le lapin est donc immunisé contre deux doses sûrement mortels de culture du bacille dysentérique de SHIGA par l'injection de ,25 cm³ d'une culture du Bactériophage anti L'immunité anti-toxique est établie six jours après l'injection, elle persiste au moins endant trois mois.

Ici nul doute n'est possible, le Bactériophage en tant qu'être ivant ne joue certainement aucun rôle dans le déclanchement du rocessus d'immunité, seuls sont responsables les principes solubles ontenus dans la culture (1).

Avant de passer à l'expérimentation sur l'homme, je me suis ssuré sur moi-même que l'administration de cultures de Bactériohage anti-SHIGA n'offrait aucun inconvénient. J'ai d'abord ingéré es quantités croissantes de cultures âgées de six jours à un mois, e 1 à 30 cm³, sans ressentir le plus léger malaise. Trois personnes e ma famille en ont ensuite ingéré des quantités variables à pluieurs reprises, sans jamais présenter le moindre trouble. Je me uis ensuite injecté, par voie sous-cutanée, 1 cm³ d'une culture gée de quarante jours, sans présenter la plus légère réaction locale ù générale. Dans tous les cas, 24 heures après l'ingestion où l'injecon, j'ai pu isoler des déjections un Bactériophage doué pour le acille de SHIGA d'une virulence égale à celle que présentait l'ultraicrobe administré.

Plus récemment G. ELIAVA a reçu par voie sous-cutanée 5 cm³ 'une culture de Bactériophage anti-SHIGA âgée de 30 jours, sans résenter aucune réaction, ni locale ni générale.

On sait que l'injection sous-cutanée de bacilles de SHIGA tués

(1) J'ai effectué plusieurs expériences d'immunisation avec des cultures de actériophage anti-typhique et anti-paratyphiques A et B, sur des animaux e laboratoire, cobayes ou lapins. Dans tous les cas j'ai obtenu une immuniation parfaite, si toutefois il est permis d'employer le mot d'immunisation uand il s'agit d'animaux réfractaires. N'attribuant aucune valeur à des expéiences de ce genre, je ne les cite que pour mémoire. Dans tous les cas le actériophage administré, soit par voie sous-cutanée, soit par voie buccale, pu être isolé peu d'heures après du contenu intestinal.

par un procédé quelconque ne peut être faite par suite des réactions extrêmement violentes qu'elle provoque et qui sont dues à la toxicité de ce germe ; c'est même ce qui a empêché l'extension à la dysenterie de la méthode de vaccination par corps bactériens, telle qu'elle est pratiquée pour la typhoide.

L'inocuité absolue de l'injection de cultures du Bactériophage anti-SHIGA, qui contient pourtant la substance des corps bacillaires à l'état dissous, montre bien que ces substances subissent de profondes modifications sous l'influence des lysines sécrétées par l'ultramicrobe bactériophage ; ces nouvelles substances jouissent pourtant d'un pouvoir immunisant spécifique beaucoup plus considérable que les substances primitives : les expériences sur le lapin et surtout les exemples fournis en ce qui concerne l'immunisation contre le barbone le démontrent sans aucun doute possible.

La vaccination préventive contre la dysenterie bacillaire au moyen des cultures du Bactériophage anti-dysentérique est donc applicable à l'homme ; il y aurait naturellement lieu de pratiquer les injections préventives avec un mélange de cultures de Bactériophage anti-SHIGA, anti-FLEXNER et anti-HISS, mélange qui constituerait un vaccin anti-dysentérique polyvalent.

Le Bacille de SHIGA étant l'un des germes les plus toxiques connus, il était à présumer que l'innocuité de l'injection des cultures du Bactériophage devait être un fait général, quelle que fut la bactérie aux dépens de laquelle se soit fait la culture. Pour le vérifier je me suis administré, par voie sous-cutanée 1/2 cm³ de culture de Bactériophage anti-pesteux, je n'ai pas présenté la plus minime réaction locale ou générale. Un examen des selles pratiqué 24 heures après l'injection m'a permis d'en isoler un Bactériophage jouissant d'une virulence pour le bacille pesteux égale à celle qu'il possédait dans la culture injectée. J'ai répété l'expérience sur moi-même avec un culture de Bactériophage anti-typhique, G. ELIAVA avec une culture de Bactériophage anti-staphylococcique : le résultat a toujours été le même. Cela vient confirmer en outre le fait, que j'ai observé à plusieurs reprises, qu'administré, soit par injection soit par ingestion, le Bactériophage passe peu de temps après dans l'intestin . il s'élimine rapidement s'il ne s'y trouve pas en contact avec la bactérie vis-à-vis de laquelle il possède la virulence, ce qui est le cas en milieu indemne ; il s'y cultive au contraire et s'y maintient virulent s'il se trouve au contact de cette bactérie, ce qui, comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, se

produit en milieu contaminé, chez les animaux qui restent sains ou qui, atteints, ont guéri.

Après m'être assuré de l'innocuité de l'ingestion de cultures du Bactériophage anti-SHIGA, j'en ai tenté l'administration à titre curatif à des malades atteints de dysenterie bacillaire (1). Comme il s'agissait d'expériences, je me suis limité au traitement des seuls cas dans lesquels la nature de la maladie était prouvée par l'isolement du bacille pathogène et où, de plus, la virulence du Bactériophage intestinal était nulle vis-à-vis des divers bacilles dysentériques lors de l'administration de la culture du Bactériophage Il est évident qu'en pratique courante il n'y aurait pas lieu de se préocuper de ces faits, étant surtout donné que l'administration de cultures du Bactériophage est toujours inoffensive.

Dans chacun des cas suivants, l'unique traitement institué a été l'ingestion de culture du Bactériophage.

ROBERT K. . 11 ans Dysenterie de moyenne gravité 5 à 7 selles sanglantes par jour

1er août. Examen des selles : présence du Bacille dysentérique de SHIGA, Virulence du Bactériophage intestinal coli ++, SHIGA 0, FLEXNER 0, HISS 0

2 août, 10 heures : ingestion de 2 cm^3 de culture du Bactériophage anti-SHIGA (25 jours après la lyse) 3 selles sanglantes au cours de l'après-midi, une selle non sanglante dans la soirée.

3 août, 1 selle moulée.

Examen : absence du Bacille de SHIGA Virulence du Bactériophage intestinal; Coli ++++, SHIGA ++++, FLEXNER +++, HISS +++.

8 août : COLI +++, SHIGA +,. FLEXNER 0, HISS +

Le malade sort guéri de l'hôpital le 9 août.

(1) Expériences réalisées avec la collaboration de M. NADAL, dans le Service du Pr. HUTINEL, à l'Hôpital des Enfants Malades.

Des essais ont été également tentés dans la diarrhée toxique des nourrissons : je n'en parlerai pas car je ne suis pas encore arrivé à une conclusion il existe ici une difficulté spéciale car la bactérie pathogène n'est pas encore connue; il s'agit tout d'abord de la déterminer avant de pouvoir isoler et cultiver une souche active du Bactériophage qui puisse être utilisée à titre curatif. Il est même vraisemblable qu'il existe non pas une, mais des diarrhées des nourrissons causées par des bactéries différentes (ce qui résulterait d'ailleurs également des recherches effectuées depuis plusieurs années par NOBÉCOURT). La solution du problème n'est pas impossible, mais il faudrait administrer au nourrisson atteint un mélange de cultures des diverses souches du Bactériophage, actives vis-à-vis des diverses bactéries susceptibles de provoquer la diarrhée. On conçoit que dans de telles conditions les recherches soient fort longues.

ANDRÉ B..., 10 ans. Dysenterie de moyenne gravité. Du 25 au 29 août inclus de 9 à 11 selles sanglantes par jour.

28 août : examen des selles, présence du bacille de SHIGA. Bactériophage intestinal : Coli +, SHIGA o, FLEXNER o, HISS o.

29 août à 16 heures : ingestion de 2 cm³ de culture du Bactériophage anti-SHIGA (2 mois après la lyse).

30 août : 1 selle sanglante le matin puis 5 selles non sanglantes l'après-midi et durant la nuit.

31 août : 3 selles liquides non sanglantes.

Examen : absence de bacilles de SHIGA. Virulence du Bactériophage intestinal : Coli ++++, FLEXNER ++, HISS +++, SHIGA ++++.

1er septembre : 1 selle liquide non sanglante.

2 septembre : 1 selle liquide non sanglante.

3 septembre : 1 selle moulée.

Bactériophage intestinal : Coli +++, SHIGA ++++, FLEXNER +++, HISS +.

8 septembre : Bactériophage intestinal : Coli ++, SHIGA o, FLEXNER o, HISS +.

Sort de l'hôpital le 9 septembre.

ROBERT D..., 12 ans. Dysenterie très grave avec vomissements, sueurs froides, refroidissement des extrémités ; selles incoercibles et incomptables.

8 septembre : selles incomptables, fétides, purulentes, avec stries sanglantes. Examen : présence de bacilles de SHIGA (environ 1 colonie sur 10 sur les plaques d'isolement).

Virulence du Bactériophage : Coli o, SHIGA o, FLEXNER o, HISS o.

9 septembre : ingestion à 11 heures de 2 cm³ de culture du Bactériophage (3 mois et demi après la lyse).

Dans l'après-midi et la nuit, selles un peu moins nombreuses, mais présentant le même aspect.

10 septembre : 6 selles liquides non sanglantes.

Examen : absence de bacilles de SHIGA. Bactériophage intestinal : Coli ++++, SHIGA ++++, FLEXNER ++++, HISS +++.

11 septembre : 2 selles moulées normales.

Sort de l'hôpital le 20 septembre.

JULIEN D.., 3 ans 1/2, dysenterie très grave ; très mauvais état général. Une sœur âgée de 2 ans 1/2 est morte à domicile de dysenterie le 8 septembre.

Du 11 au 13 septembre, selles sanglantes incomptables.

13 septembre (entrée à l'hôpital). Examen : présence du Bacille de SHIGA (très abondant, environ 4 colonies sur 5 sur les plaques d'isolement) Bactériophage intestinal : Coli o, SHIGA o, FLEXNER o, HISS o.

13 septembre à 17 heures, ingestion de 2 cm³ de culture du Bactériophage (15 jours après la lyse).

14 septembre : 6 selles sanglantes. Bactériophage intestinal : Coli +++, SHIGA +++, FLEXNER ++, HISS +.

15 septembre : 1 selle sanglante, 5 selles non sanglantes.

Examen : absence du Bacille de SHIGA Bactériophage intestinal Coli ++++, SHIGA ++++, FLEXNER +++, HISS +++

16 septembre · 4 selles non sanglantes. Bactériophage intestinal ; COLI ++++, SHIGA ++++, FLEXNER ++, HISS +++.

17 septembre 1 selle liquide, 2 selles moulées. Bactériophage intestinal Coli ++++. SHIGA ++++, FLEXNER ++, HISS +.

18 septembre 2 selles moulées. Bactériophage intestinal coli ++++, SHIGA ++++, FLEXNER +, HISS ++

Sortie de l'hôpital le 26 septembre ; ce jour là, la recherche de la virulence du Bactériophage donne Coli +++, SHIGA 0, FLEXNER 0, HISS +.

EMILE D. , 7 ans 1/2, frère du précédent Dysenterie grave Les 11 et 12 septembre · 20 à 25 selles liquides, fétides non sanglantes.

12 septembre. Examen des selles , bacilles de SHIGA très abondants. Bactériophage intestinal : Coli 0, SHIGA 0, FLEXNER 0, HISS 0

13 septembre 25 selles sanglantes, à 17 heures ingère 2 cm^3 de culture du Bactériophage (6 mois 1/2 après la lyse)

14 septembre 4 selles sanglantes dans la matinée, 2 selles non sanglantes l'après-midi. Examen d'une de ces dernières · absence du Bacille de SHIGA. Virulence du Bactériophage intestinal Coli ++++, SHIGA ++++, FLEXNER ++, HISS +++.

15 septembre · 5 selles non sanglantes.

16, 17, 18 septembre 3 à 4 selles non sanglantes par jour.

19 septembre · 2 selles moulées.

Sort de l'hôpital le 28 septembre

Dans tous ces cas l'état général a toujours coïncidé avec la gravité des symptômes intestinaux.

Deux autres cas de dysenterie à Bacille de SHIGA, traités de la même manière, mais en dehors de l'hôpital, m'ont fourni un résultat semblable : cessation des selles sanglantes avec amélioration parallèle de l'état général dans les 24 heures suivant l'administration de la culture du Bactériophage anti-SHIGA.

Il est évident que sept cas ne sont pas suffisants pour constituer une preuve absolue en faveur du traitement spécifique de la dysenterie bacillaire au moyen de la culture du Bactériophage antidysentérique ; ils suffisent toutefois pour montrer que l'ingestion de cultures du Bactériophage virulent pour la bactérie en cause est aussi inoffensif pour le malade que pour l'homme sain, que le Bactériophage ingéré franchit les premières voies digestives chez l'homme aussi bien que chez l'animal et passe, après peu d'heures, dans l'intestin où il se cultive aux dépens des bactéries vis-à-vis desquelles il est virulent. Ces sept cas [illegible] d'ailleurs une signification du fait que les [illegible] enrayent

galement la maladie dans le cas de la typhose aviaire, comme il ésulte des expériences qui ont été exposées, expériences portant ur une centaine de cas

Tous ces faits autorisent les cliniciens à poursuivre les expériences de traitement sur une plus grande échelle, tant dans la dysenteie bacillaire que dans les autres maladies infectieuses humaines pour lesquelles j'ai jusqu'ici isolé des souches du Bactériophage actives vis-à-vis de bactéries pathogènes : fièvre typhoïde et paratyphoïdes et peste bubonique.

Quelle que soit d'ailleurs la maladie considérée, l'isolement d'une souche active du Bactériophage vis-à-vis de la bactérie pathogène est aisé, du moment qu'il s'agit d'une maladie aiguë dont la bactérie est connue et cultivable : il suffit d'appliquer les principes qui ont été développés au cours de cet ouvrage.

CHAPITRE IV

LE BACTÉRIOPHAGE ET L'IMMUNITÉ

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Le Bactériophage, *Bacteriophagum intestinale* de d'HERELLE 1918, ultramicrobe parasite des bactéries, existe normalement dans l'intestin des animaux, vertébrés et invertébrés. La possibilité de numération des ultramicrobes est le point capital de l'étude du Bactériophage, car il permet de suivre son développement et de saisir son mode d'action *in vitro* et *in vivo* Parasite obligé, le Bactériophage ne vit qu'aux dépens de bactéries vivantes et normales qui constituent son unique milieu de culture. Les expériences et l'examen ultramicroscopique concordent pour montrer que l'ultramicrobe Bactériophage pénètre à l'intérieur d'une bactérie, y forme une colonie de quinze à vingt-cinq éléments en l'espace d'une heure à une heure et demie; la bactérie éclate alors, libérant les jeunes ultramicrobes. Le Bactériophage utilise pour son développement la substance des bactéries qu'il solubilise à l'aide de diastases lytiques qu'il sécrète; la propriété possédée par le Bactériophage de sécréter une lysine active pour une bactérie donnée, ce qui lui permet de pénétrer dans cette bactérie et de s'y reproduire, représente, au sens strict du mot, la virulence vis-à-vis de cette bactérie.

Il n'existe qu'une seule espèce de Bactériophage, commune à tous les animaux, susceptible par accoutumance d'acquérir la virulence vis-à-vis des diverses espèces bactériennes, vraisemblablement de toutes les espèces.

De même qu'il existe pour chaque bactérie pathogène toute une gamme de virulences pour un animal donné, de même chaque souche

de Bactériophage possède une virulence propre. Nous pouvons exalter ou atténuer la virulence d'une bactérie pathogène, le même phénomène s'obtient avec le Bactériophage. Enfin l'organisme supérieur parasité se défend contre les sécrétions bactériennes et est susceptible d'acquérir l'immunité antitoxique, la bactérie attaquée par le Bactériophage ne reste pas passive, elle lutte, elle peut vaincre et acquérir une immunité antilytique. Toutes les péripéties de la lutte entre l'animal et la bactérie se retrouvent dans la lutte entre le Bactériophage parasite et la bactérie attaquée : la similitude est complète, nous descendons seulement d'un degré dans l'ordre de grandeur des êtres en présence.

L'existence du Bactériophage dans l'intestin de tous les êtres vivants, son exiguité qui lui permet de filtrer à travers des sols imperméables aux bactéries, sa vitalité et sa résistance aux agents de destruction, expliquent son extrême diffusion dans la Nature.

Une souche quelconque du Bactériophage est rarement active au sortir de l'organisme vis-à-vis d'une seule espèce bactérienne, elle attaque généralement plusieurs espèces à la fois et possède pour chacune d'elle une virulence variable. Le Bactériophage est un, mais il existe des infinités de souches possédant chacune, au sortir de l'organisme, le pouvoir d'attaquer un certain nombre de bactéries. Une même souche est essentiellement variable dans le temps, comme intensité d'action vis-à-vis de chaque espèce bactérienne, et comme étendue d'action eu égard au nombre d'espèces bactériennes attaquées. Toutes les combinaisons de virulence étant possibles en quantité comme en qualité, on comprend, vu le nombre infini de combinaisons possibles, qu'il n'existe pas deux souches de l'ultramicrobe bactériophage qui soient identiquement semblables.

Dans une émulsion bactérienne inoculée avec une culture d'une souche active du Bactériophage, ce n'est pas toujours ce dernier qui l'emporte : si la bactérie parvient à acquérir la résistance, il se produit une sélection de bactéries de plus en plus résistantes qui aboutit à la formation d'un état d'équilibre entre la bactérie résistante et le Bactériophage virulent qui coexistent alors dans le milieu ; il se produit une culture mixte dans laquelle l'équilibre est plus ou moins stable et est susceptible de se rompre en faveur de l'un ou de l'autre des germes en présence, suivant les circonstances du moment.

L'acquisition de la résistance s'accompagne de changements dans la morphologie et les propriétés de la bactérie : les bacilles prennent

un aspect cocciforme et s'entourent d'une capsule ; ils deviennent inagglutinables ; résistent à la phagocytose ; ils sont doués d'une vitalité très grande et d'une virulence exaltée La perte de la résistance s'accompagne du retour à la forme et aux propriétés normales

Le Bactériophage est donc susceptible d'acquérir la virulence vis-à-vis d'une bactérie donnée, la bactérie de son côté est susceptible d'acquérir la résistance vis-à-vis du Bactériophage : la virulence de l'un et la résistance de l'autre ne sont pas fixes mais essentiellement variables, s'exaltent ou s'atténuent suivant les conditions héréditaires de chacun des deux germes en présence et des circonstances du moment qui favorisent l'un ou l'autre des deux antagonistes. Ces deux phénomènes dominent la pathogénie et la pathologie des maladies infectieuses.

L'ultramicrobe bactériophage est un hôte normal de l'intestin : parasite obligé, il s'y maintient aux dépens des bactéries saprophytes douées héréditairement d'une certaine résistance, avec lesquelles il vit en commensalité. Une bactérie quelconque, pathogène ou non, s'introduit-elle dans l'intestin, le Bactériophage exalte sa virulence vis-à-vis de l'envahisseur et cela d'autant plus rapidement que cette bactérie est dénuée de résistance et que le Bactériophage lui-même est héréditairement plus entraîné à la lutte : plus les réinfections par une bactérie donnée sont fréquentes, plus apte est le Bactériophage à acquérir rapidement un degré de virulence suffisant pour empêcher, dès le début, toute culture. Si la bactérie qui envahit un individu est l'agent d'une maladie intestinale ou à voie d'accès intestinale, l'infection est alors enrayée d'emblée et la maladie avorte avant tout symptôme morbide.

L'adaptation rapide du Bactériophage peut être retardée ou même empêchée par suite de circonstances défavorables : plus sensible que les bactéries à l'action des acides et des bases, la réaction du milieu est le facteur principal qui influe sur le développement du Bactériophage et sur son pouvoir d'attaque, d'un autre côté, son activité peut être annihilée si le germe envahisseur sort d'un organisme dans lequel il a eu à lutter contre le Bactériophage, lutte qui lui a permis d'acquérir un degré plus ou moins élevé de résistance. Dans l'un ou l'autre cas la bactérie pathogène se cultive et la maladie se déclare. Si les circonstances de milieu restent défavorables et entravent l'action du Bactériophage, la bactérie se développe librement et l'individu envahi succombe. Sinon la lutte se poursuit entre [illegible]

le Bactériophage, dont la virulence s'exalte peu à peu par suite d'une sélection des ultramicrobes les plus aptes, la bactérie de son côté est susceptible d'acquérir la résistance et d'exalter cette résistance par suite également d'un phénomène de sélection : l'état de l'individu au sein duquel la lutte se poursuit enregistre fidèlement les péripéties de cette lutte. La convalescence ne s'établit que du moment où la virulence du Bactériophage domine définitivement la résistance de la bactérie. Si le contraire se produit, si la bactérie acquiert l'état réfractaire, aucune barrière ne s'oppose plus à l'envahissement de l'individu qui succombe fatalement.

En un mot, la guérison se produit toujours par suite d'une exaltation de la virulence du Bactériophage, suffisante pour lui permettre de parasiter et de détruire les bactéries pathogènes implantées dans l'organisme. La mort survient, soit par suite de l'inertie du Bactériophage, soit par suite de l'acquisition par la bactérie de l'état réfractaire, ce qui permet à cette dernière, dans l'un et l'autre cas, de se développer sans entraves.

Un troisième cas peut se présenter : on isole du contenu intestinal des « porteurs de germes », typhiques ou dysentériques, et cela d'une manière constante, la bactérie pathogène résistante et le Bactériophage virulent pour la bactérie : il y a commensalité (comme c'est le cas pour les saprophytes normaux de l'intestin), autrement dit culture mixte ; en général l'équilibre est assez rapidement rompu en faveur du Bactériophage. Chez l'individu qui deviendra porteur de germes, la lutte se poursuit dans l'intestin entre le Bactériophage et la bactérie pendant un temps suffisamment long pour permettre à l'immunité organique de s'établir avant que le Bactériophage soit parvenu à dominer complètement la bactérie Les bactéries n'agissent sur l'organisme que par le moyen de leurs toxines · une bactérie dont la toxine n'exerce plus d'action sur les cellules d'un animal est aussi inoffensive pour lui qu'une bactérie naturellement atoxique ; du moment où l'immunité organique est acquise par le porteur, la bactérie pathogène devient pour lui saprophyte.

On comprend d'autre part le danger de la contamination par les porteurs de germes qui, s'ils répandent un Bactériophage virulent, répandent également une bactérie résistante, c'est-à-dire particulièrement apte à anihiler la défense exercée par le Bactériophage intestinal chez les individus susceptibles d'être contaminés par le porteur.

Les observations faites dans la pyélonéphrite permettent de penser

ue l'individu atteint d'une maladie infectieuse chronique est en réa-
té un porteur interne ; là aussi, l'individu jouit de l'immunité anti-
oxique, la lutte se poursuit au sein de l'organisme même entre le
actériophage virulent et la bactérie résistante · mais tandis que
ans l'intestin la présence de la bactérie désormais inoffensive n'offre
as grand inconvénient pour l'individu qui l'abrite, la présence
'une culture bactérienne au sein des tissus n'est pas indifférente
ar suite des réactions inflammatoires qu'elle provoque. La phago-
ytose d'autre part ne peut jouer un rôle actif : nous avons vu que
s bactéries ayant acquis la résistance vis-à-vis du Bactériophage,
ésistaient également à la phagocytose.

Le rôle du Bactériophage ne se borne pas à la défense intestinale : uelle que soit la maladie infectieuse considérée, il y a toujours ntroduction de la bactérie pathogène dans l'intestin, soit par voie igestive, soit par voie hépatique; le Bactériophage intestinal est onc toujours susceptible d'être, à un moment donné, en contact vec la bactérie pathogène et à même d'acquérir la virulence vis--vis de cette bactérie. L'expérience montre de plus que le Bacté-ophage est susceptible de pénétrer dans la circulation à la faveur 'une septicémie et qu'il peut aller exercer son action en un point uelconque de l'organisme.

L'action du Bactériophage se manifeste encore d'une autre anière : en se cultivant aux dépens des bactéries, il les dissout ; la ubstance des bactéries, dissoute et modifiée sous l'action des lysines écrétées par le Bactériophage, se trouve placée dans un état physique et chimique particulièrement propre à impressionner les cellules de l'organisme qui élaborent les antitoxines.

L'expérience montre enfin que le Bactériophage exerce une action prépondérante dans la phagocytose . d'une part, les lysines du Bactériophage possèdent un pouvoir opsonique extrêmement élevé (1), 'autre part une bactérie résistante au Bactériophage est, par ce it même, résistante à la phagocytose.

Le Bactériophage, agent direct de l'immunité antimicrobienne, qui st par conséquent hétérologue, tout au moins chez l'animal sensible, est aussi indirectement un agent d'immunité organique, par onséquent homologue.

L'histoire de la maladie est en définitive l'histoire de la lutte entre

(1) Lysines du Bactériophage et antilysines bactériennes ne seraient-elles as synonymes d'opsonines et agressines ?

le Bactériophage et une bactérie Nous retrouvons les mêmes faits, mais sur une plus grande échelle, dans l'épidémie.

L'ultramicrobe virulent, qui existe dans l'intestin de tous les convalescents, est répandu par ceux-ci avec leurs déjections : il est donc susceptible de contaminer les individus sensibles environnants, et cela qu'il s'agisse d'une maladie intestinale, d'une maladie septicémique ou d'une maladie à localisations.

L'étude montre que l'histoire d'une épidémie enregistre en dernière analyse les péripéties de la lutte entre deux agents, la bactérie pathogène et l'ultramicrobe bactériophage, et que ce dernier est transmissible d'individu à individu : l'immunité est contagieuse au même titre que la maladie elle-même. Le début de l'épidémie est marqué par la diffusion d'une bactérie dont la virulence s'exalte progressivement par passages par individus sensibles, l'épidémie se répand ; l'ultramicrobe bactériophage exalte à son tour sa virulence pour la bactérie pathogène, se répand également ; l'épidémie cesse quand tous les individus sensibles sont contaminés par le Bactériophage virulent

Nous avons vu que le Bactériophage était susceptible de conserver longtemps une virulence « latente » pour une bactérie donnée ; ces virulences latentes, entretenues d'ailleurs par les contaminations accidentelles, expliquent la différence qui existe entre le mode de propagation des maladies sporadiques et des maladies épidémiques : vis-à-vis des bactéries, agents des premières, le Bactériophage est toujours prêt à intervenir et ce n'est qu'exceptionnellement que la contamination est suivie de maladie ; pour les secondes au contraire, le germe morbide étant d'ailleurs le plus souvent importé, le Bactériophage ne jouit au début d'aucune virulence, l'épidémie se répand et ne cesse, ou ne prend l'allure sporadique, que par suite de la diffusion du Bactériophage devenu virulent vis-à-vis de la bactérie pathogène dans l'organisme des convalescents.

L'ultramicrobe bactériophage virulent pour une bactérie donnée est cultivable *in vitro*, il est donc possible de l'obtenir en quantité aussi grande qu'on le désire : si son pouvoir protecteur est réel il nous suffit de l'introduire dans l'organisme d'un individu sensible pour placer cet individu dans le même état réfractaire dans lequel il se trouverait s'il avait résisté naturellement à la contagion. C'est ce que démontrent les expériences effectuées dans la typhose aviaire et la septicémie hémorragique du Buffle.

L'injection à un individu sensible d'une culture du Bactériophage

irulent vis-à-vis d'une bactérie donnée est inoffensive et ne provoque aucune réaction, même quand il s'agit de culture du Bactériophage développé aux dépens des bactéries les plus toxiques, le bacille dysentérique ou le bacille pesteux par exemple.

Les ultramicrobes injectés passent rapidement dans l'intestin.

L'injection d'une culture du Bactériophage provoque :

1° L'immunité antimicrobienne hétérologue, immédiatement, par le fait même de la présence dans l'organisme du Bactériophage virulent vis-à-vis de la bactérie en cause. En milieu non épidémique cette immunité est passagère; en milieu épidémique elle persiste aussi longtemps que se produisent les réinfections.

2° L'immunité organique ou homologue, d'une durée encore indéterminée (plus de sept mois dans le cas de la typhose aviaire); elle se produit, après un temps d'incubation, par suite de la production d'anticorps spécifiques, vraisemblablement assimilables aux antitoxines, décelables dans le sérum des animaux immunisés. Le temps d'incubation est d'autant plus long que la dose injectée a été plus élevée.

Les expériences d'immunisation contre le barbone nous ont montré l'importance de la question de la dose : la quantité de culture du Bactériophage nécessaire et suffisante pour provoquer la formation de l'immunité organique doit, dans tous les cas, être injectée en une seule fois. Quant à la dose elle-même elle varie certainement suivant la maladie considérée et, par conséquent, la bactérie aux dépens de laquelle s'est développée le Bactériophage dont la culture est injectée (1). Dans la septicémie hémorragique du Buffle la dose unique optima est de un quart de centimètre cube par 100 kgr. de poids; elle devra être fixée par expériences préalables pour les autres maladies (2).

La maladie une fois déclarée, l'introduction de l'ultramicrobe bactériophage virulent pour la bactérie en cause dans l'organisme

(1) Je ne parle ici que de l'*injection* : l'ingestion de cultures du Bactériophage ne semble pas produire l'immunité organique : les ingestions peuvent être répétées sans aucun inconvénient, je l'ai vérifié sur moi-même.

(2) J'appelle également l'attention des expérimentateurs sur le fait que les cultures du Bactériophage employées pour l'immunisation doivent être parfaitement limpides, c'est-à-dire que la lyse doit être complète; de plus la filtration sur bougie est *indispensable*, nous en avons vu la raison. A la rigueur on pourrait remplacer la filtration par un chauffage à 58°; la filtration est préférable.

malade, doit mettre l'individu atteint dans les mêmes conditions où se trouve l'individu convalescent. Les expériences réalisées dans la typhose aviaire et la dysenterie humaine montrent en effet que l'injection ou l'ingestion de cultures du Bactériophage exercent une action curative

L'administration au malade de la culture du Bactériophage actif doit, cela se conçoit, être faite à un moment aussi rapproché que possible du début de la maladie, et cela pour deux raisons :

1° Nous avons vu que l'acquisition de la virulence par le Bactériophage ne représente qu'un côté de la question de la guérison : la bactérie peut acquérir un état de résistance tel que l'action du Bactériophage soit annihilée ; l'administration d'une culture du Bactériophage actif aura donc d'autant plus d'action que la résistance de la bactérie sera moindre ; d'autre part l'acquisition de la résistance se produisant par suite d'une lutte qui se poursuit au sein de l'organisme entre le Bactériophage et la bactérie : plus rapide sera l'intervention, moins grandes seront les probabilités de résistance.

2° S'il existait déjà au moment de l'intervention des lésions organiques incompatibles avec la vie, quelle que puisse être l'action du Bactériophage, l'issue de la maladie ne pourrait qu'être fatale.

En résumé, l'observation et l'expérience concordent pour montrer que le Bactériophage est l'agent direct de l'immunité antimicrobienne chez l'animal sensible : il dissout les bactéries aux dépens desquelles il se reproduit et cela au moyen des lysines qu'il sécrète et qui restent en solution une fois les bactéries détruites Ces lysines jouissent de plus d'un pouvoir opsonique extrêmement élevé, ce qui peut contribuer également, dans certains cas, à assurer la destruction des bactéries pathogènes.

Le Bactériophage contribue également à l'établissement de l'immunité organique : la substance des bactéries dissoute sous l'action des lysines, se trouve placée dans un état physique et chimique tels qu'une quantité extrêmement faible de cette substance suffit pour provoquer la formation d'une immunité organique puissante.

L'immunité acquise à la suite d'une unique injection d'une petite quantité d'une culture du Bactériophage s'accompagne de l'apparition dans le sang d'un principe protecteur. L'animal qui reçoit ce sang jouit d'une solide immunité vis-à-vis de la bactérie aux dépens de laquelle le Bactériophage injecté à l'animal producteur de sérum s'était développé. Nous avons vu que ce principe protecteur était vraisemblablement une antitoxine. Il est possible que ce nouveau

procédé d'obtention de sérums immunisants fournisse le moyen d'intervenir au cours de la maladie, même dans le cas où l'administration de culture du Bactériophage actif soit restée sans action par suite de l'acquisition antérieure de la résistance par la bactérie

La notion du Bactériophage, agent d'immunité cultivable, permet enfin d'entrevoir la possibilité d'une intervention collective au cours des épidémies.

Quelle que soit l'épidémie (pourvu, cela va sans dire, que l'agent en soit connu et cultivable), nous avons d'abord la possibilité de la vaccination individuelle au moyen d'une unique injection d'une minime quantité de culture du Bactériophage actif vis-à-vis de la bactérie en cause. Mais nous avons vu que la présence dans l'intestin d'ultramicrobes bactériophages actifs assurait la protection de l'individu sensible, nous pouvons donc envisager la possibilité de l'immunisation collective de la population, car il serait facile de mélanger à l'eau potable des cultures du Bactériophage, surtout dans les agglomérations urbaines où l'eau est distribuée par canalisation. On assurerait ainsi la permanence du Bactériophage actif dans l'intestin de tous les individus sensibles pendant la durée de la période critique. La méthode ne présenterait aucun risque : les cultures du Bactériophage peuvent être ingérées sans inconvénients, quelle qu'en soit la quantité.

Malgré que j'aie spécifié à plusieurs reprises au cours de cet ouvrage que les recherches entreprises ne visaient que l'immunité antimicrobienne *chez l'animal sensible*, je tiens en terminant, et pour éviter toute équivoque, à dire quelques mots au sujet de la phagocytose, car il pourrait paraître étrange que, parlant de l'immunité antimicrobienne, je ne fasse pas allusion à ce mode de défense.

Je ne conteste aucune des conclusions de Metchnikoff touchant le rôle de la phagocytose dans l'immunité naturelle qui caractérise l'état réfractaire.

Dans l'immunité acquise, Metchnikoff et ses collaborateurs affirment que, là aussi, la phagocytose joue un rôle capital. Que l'élimination des bactéries s'effectue par phagocytose, *une fois l'immunité organique établie*, c'est ce qui semble bien résulter de leurs travaux.

Dans l'un ou l'autre cas d'ailleurs, le Bactériophage manifeste quand même son action : son activité ne se limite naturellement pas aux bactéries pathogènes pour un animal donné, elle s'exerce indis- [illegible]

tinctement et dans toutes les circonstances chez tous les animaux vis-à-vis des bactéries pathogènes ou saprophytes, mais, chez l'animal *immun*, le Bactériophage resterait-il inerte, que les bactéries n'en seraient pas moins éliminées par phagocytose.

Que reste-t-il donc pour le rôle du Bactériophage dans l'immunité? La défense de l'individu *sensible* exposé à la contagion et la défense de cet organisme sensible au cours de la maladie *naturelle*. En d'autres termes, le Bactériophage joue un rôle prépondérant dans les phénomènes d'immunité qui s'accomplissent chez l'individu *sensible*, c'est par suite de sa présence, qu'exposé à la contagion il peut rester indemne; c'est par suite de sa présence que, malade, il peut guérir.

TABLE DES MATIÈRES

Bibliographie I
Avant-Propos I

PREMIÈRE PARTIE

LE BACTÉRIOPHAGE

Introduction. 5

CHAPITRE PREMIER

La bactériolyse

Technique de l'isolement du Bactériophage . 11
Technique de l'exaltation de la virulence . . 16
Numération des ultramicrobes bactériophages 17
Multiplication des ultramicrobes bactériophages . . . 20
Le Bactériophage : parasite obligé. 24
Influence de l'état de la bactérie . . . 26
Influence du milieu 28
Cultures sur milieux solides Colonies isolées . . . 30
Influence de la concentration du milieu en bactéries . . 34
Action inhibitive des produits de la lyse 34
Influence des conditions physiques extérieures . . . 37
Action des antiseptiques sur la lyse . . . 38
Substances bactériennes solubilisées . . . 41
L'ultramicrobe bactériophage, parasite interne . 42
Le bactériolyse au microscope 45

CHAPITRE II

Le Bactériophage et la bactérie

Virulence du Bactériophage 50
Résistance de la bactérie. 52
Origine des cultures secondaires 55
Instabilité des cultures mixtes 58
Caractère des cultures mixtes 59

La bactérie résistante 64
Observations microscopiques 68
Acquisition de la résistance. 69
Cultures multiples . . . 71

CHAPITRE III

Virulence du Bactériophage

Virulences multiples 73
Persistance de la virulence 74
Espèces bactériennes attaquées 79
Bacille dysentérique de SHIGA . . . 80
Bacille dysentérique de HISS. . . 81
Bacille dysentérique de FLEXNER 82
Bacille dysentérique X . . . 82
B coli 83
Bacille typhique 83
Bacille paratyphique A 83
Bacille paratyphique B 84
Salmonella 84
B typhi murium 84
B proteus 84
B gallinarum 84
Bacille dyphtérique 85
Staphylocoque 85
Bactérie du barbone . . . 85
Bacille pesteux. 86
Bacille de la flacherie 86
Bacillus subtilis 86
Vibrion cholérique 86

CHAPITRE IV

L'ultramicrobe bactériophage

Morphologie 87
Vitalité 89
Action des divers agents 90
Unicité du Bactériophage . . 93
Les lysines du Bactériophage 94
Pouvoir opsonique des lysines 96
Nature du Bactériophage 100

CHAPITRE V

Le sérum anti-bactériophage

Complexité des anti corps 105
Anticorps vis-à-vis des bactéries 107

Anticorps vis-à-vis des toxines . 107
Anticorps vis-à-vis des ultramicrobes bactériophages . 109
Anticorps vis-à-vis des lysines 112

DEUXIEME PARTIE

ROLE DU BACTÉRIOPHAGE DANS L'IMMUNITÉ

Introduction 119

CHAPITRE PREMIER

Le Bactériophage dans la maladie

Choix des maladies d'étude . 127
Dysenterie bacillaire 130
Infections à colibacille . . 140
Fièvres typhoïde et paratyphoïdes 141
Typhose aviaire 150
Septicémie hémorragique du Buffle (Barbone) 162
Peste bubonique 169
Flacherie 172
Conclusion . . 173

CHAPITRE II

Le Bactériophage chez l'individu sain

Le Bactériophage chez l'Homme sain . 174
Le Bactériophage chez le Cheval . . 179
Le Bactériophage chez la Poule. . . . 182
Le Bactériophage chez divers animaux 183
Conclusion 185

CHAPITRE III

L'immunisation par le Bactériophage

Immunisation contre la typhose aviaire . . 187
Immunisation contre le Barbone 194
Immunisation contre la Dysenterie . . . 207

CHAPITRE IV

Le Bactériophage et l'immunité

Résumé et conclusion 215

LAVAL. — IMPRIMERIE BARNÉOUD.